



**Márcia Teresa
Jesus Tavares**

**Validação de método HPLC-UV para determinação
de impurezas genotóxicas**



**Márcia Teresa
Jesus Tavares**

Validação de método HPLC-UV para determinação de impurezas genotóxicas

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestrado Integrado em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Prof.^a Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Dália Maria Dias Barbosa, directora adjunta do laboratório de desenvolvimento - CIPAN.

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para a pessoa que sou.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin

Prof. Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira

Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Dália Maria Dias Barbosa

Directora adjunta do laboratório de desenvolvimento - CIPAN- Companhia Produtora de Antibióticos S.A.

Prof.^a Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Engenheira Paula Cristina Oliveira Barroso Dantas

Técnica Superior do Laboratório de Controlo de Qualidade - CIPAN - Companhia Produtora de Antibióticos S.A.

agradecimentos

Agradeço antes de mais a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à CIPAN SA pela oportunidade que me deu, sem dúvida vai contribuir muito para a minha vida profissional e pessoal, em especial ao Eng. Manuel Fernandes, Dr.^a Dália Barbosa, Eng.^a Cristina Dantas, Dr.^a Fernanda Grilo e Dr. Ricardo Figueiredo pela paciência com que sempre ouviram as minhas dúvidas e ajudaram a ultrapassar cada etapa do trabalho, sem a vossa ajuda não obteria o mesmo sucesso nos resultados. A todos os analistas dos laboratórios LDNP e HPLC, a vossa ajuda foi preciosa no meu trabalho laboratorial, muito obrigada.

Não posso deixar de agradecer na Universidade de Aveiro à Dr.^a Inês Portugal, não só pela orientação científica mas também pelo apoio nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos meus amigos de sempre e de todas as horas, Marta Batista, Vanda Fernandes, Raquel Vaz, Bruno Figueiredo Joana Moreira, Fabiana Moreira, Thiemy Passarelli (USP), Claudia Deubler (USP) e Estela Martins. Também a todos os outros amigos que de alguma forma fizeram parte desta longa caminhada.

Quero agradecer aos meus pais, irmãs, cunhado e avós pelo apoio e força. Ao meu João pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e compreensão em todos os momentos desta longa e dura jornada.

Muito obrigada a todos!

palavras-chave

Impurezas genotóxicas (GIs); ingrediente activo farmacêutico (API); desenvolvimento e validação de método; análise vestigial; segurança dos medicamentos.

resumo

Impurezas genotóxicas (GIs) são compostos químicos, conhecidos ou suspeitos de serem mutagénicos e ou cancerígenos, que podem actuar directamente no ADN. Embora sejam aceitáveis doses diárias de 1,0-1,5 µg/dia deve ser aplicado um rastreio contínuo como uma medida para garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos. Este é um assunto actual e relevante para a indústria farmacêutica e suas entidades reguladoras. Nesta perspectiva, a CIPAN tem-se empenhado em cumprir todas as exigências regulamentares mas também em contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias de análise.

É comum os APIs (Active Pharmaceutical Ingredients) conterem pequenas quantidades de impurezas resultantes de resíduos, subprodutos ou intermediários do processo. Em particular, os ácidos são frequentemente utilizados na indústria química como contra-íões, catalisadores ácidos ou como protectores de remoção de grupo durante os processos de síntese. Estes ácidos devem ser controlados abaixo de certos níveis pois na presença de um álcool podem formar ésteres de ácidos que são considerados GIs.

Assim, a proposta deste trabalho é a validação de um método eficiente para a identificação e quantificação de ésteres eventualmente presentes num API. As análises foram realizadas num cromatógrafo líquido de alta pressão com detector de ultravioleta (HPLC-UV), usando o método de operação isocrático, uma coluna C-8 e outros parâmetros otimizados anteriormente no laboratório. Os ésteres em análise, éster 1 e éster 2, foram preparados por derivatização dos respectivos ácidos (matérias-primas na produção do API) com diazometano. Numa primeira etapa do trabalho, as soluções metanólicas das amostras eram filtradas antes da análise em HPLC. No entanto, detectaram-se alguns problemas analíticos inequivocamente associados à contaminação pelos filtros pelo que a etapa de filtração foi eliminada.

Os resultados obtidos para a validação do método permitem concluir: i) os dois picos cromatográficos são completamente resolvidos; ii) a resposta é linear entre $3,0 \times 10^{-4}$ mg/mL e $2,0 \times 10^{-5}$ mg/mL; iii) para analistas e dias diferentes é preciso com RDS $\leq 10\%$ e taxa de recuperação entre 98,0%; iv) o método é exacto, com valores de recuperação entre 90%-110%; v) os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) são $2,0 \times 10^{-5}$ mg/mL e $1,0 \times 10^{-5}$ mg/mL, respectivamente.

Finalmente, para aplicação do método em rotina determinou-se o factor de resposta relativo do éster 2 (preparado *in situ*) em relação ao éster 1 padrão. A determinação deste factor (RF=0.925) permitirá eliminar os procedimentos de esterificação *in situ* reduzindo simultaneamente o tempo de preparação das amostras e os riscos associados à síntese do diazometano.

keywords

Genotoxic impurities (GIs); active pharmaceutical ingredients (API); development validation methods; trace analysis; drug safety.

abstract

Genotoxic impurities (GIs) are chemical compounds, known or suspected to be mutagenic and/or carcinogenic which can act directly on DNA. Although daily dosages of 1.0-1.5 µg/day are acceptable continuous screening of GIs in pharmaceuticals is a necessary measure for quality assurance. Therefore, genotoxic impurities are a matter of great concern to the pharmaceutical industry and its regulators. As a result, CIPAN has been engaged in meeting all the regulatory requirements but also in taking a step forward in the development of new analysis methods as a preventive measure.

It is common for APIs (Active Pharmaceutical Ingredients) to contain low amounts of impurities, resulting from waste materials, by-products or process intermediates. In particular, acids are often used in the chemical industry either as counter-ions to form a salt, as acid catalysts or as protecting groups during synthesis. These acids must be controlled below certain levels because in the presence of an alcohol there is the possibility of forming acids esters which are considered GIs.

The purpose of this study is the validation of an efficient method for the identification and quantification of sulphonic esters eventually present in an API. The analysis was carried out in a high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV), using isocratic operating conditions, a C-8 column and other operating parameters previously optimized in the laboratory. The esters under analysis, ester 1 and ester 2, were prepared by derivatization of the respective acids (raw materials in the API manufacture) with diazomethane. Prior to HPLC analysis the methanolic ester solutions were filtered. However, as discussed in detail herein this step was eliminated due to baseline problems clearly associated to the filters.

The validation results obtained revealed: i) chromatograms with two completely resolved peaks; ii) the method is linear between 3.0×10^{-4} mg/mL and 2.0×10^{-5} mg/mL; iii) the method is precise for different analysts and days with RSD \leq 10.0% and recovery range 98.0%; iv) the method is accurate with recovery values between 90%-110%. The limits of quantification (LQ) and detection (LD) of the method are 2.0×10^{-5} mg/mL and 1.0×10^{-5} mg/mL, respectively.

Finally, for application of the method in routine analysis the relative response factor of methyl ester 2 *in situ* was evaluated in relation to ester 1 standard. The use of this correction factor (CF = 0.925) enables the simultaneous reduction of sample preparation time and the risks associated with diazomethane synthesis procedures.

Índice

1.	Enquadramento e Objectivos.....	1
2.	Introdução	3
2.1.	AtralCipan	3
2.2.	Tetraciclinas.....	3
2.3.	Impurezas Genotóxicas	4
2.3.1.	Regulamentação.....	5
2.3.2.	Classificação de impurezas.....	8
3.	Métodos analíticos e sua validação.....	13
3.1.	Validação de Métodos Analíticos.....	15
3.1.1.	Especificidade	16
3.1.2.	Linearidade.....	17
3.1.3.	Exactidão	17
3.1.4.	Precisão	17
3.1.4.1.	Repetibilidade.....	18
3.1.4.2.	Precisão Intermédia.....	18
3.1.4.3.	Reprodutibilidade.....	18
3.1.5.	Intervalo de linearidade	18
3.1.6.	Limite de Quantificação e Limite de Detecção	19
3.1.7.	Robustez	20
3.2.	Factor de Resposta Relativo	21
4.	Plano de Trabalho e Procedimentos	23
4.1.	Condições do método.....	23
4.2.	Materiais, Reagentes e Equipamento.....	23
4.2.1.	Preparação da fase móvel	24
4.2.2.	Preparação do diazometano.....	24
4.3.	Esterificação <i>in situ</i>	25
4.4.	Preparação e diluição das soluções	25

4.5.	Filtros.....	26
5.	Resultados e Discussão	29
5.1.	Filtros.....	29
5.2.	Reprodução das condições do método cromatográfico	36
5.3.	Testes de optimização e pré-validação do método cromatográfico	39
5.4.	Validação do método cromatográfico.....	40
5.4.1.	Especificidade	41
5.4.2.	Linearidade.....	42
5.4.3.	Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação	45
5.4.4.	Exactidão	46
5.4.5.	Precisão	46
5.4.6.	Intervalo de Linearidade.....	48
5.4.7.	Factor de resposta relativo	48
6.	Conclusões e considerações finais.....	49
7.	Bibliografia	53
	Anexos.....	55
I.	Cronograma de Estágio.....	57
II.	Desenvolvimento do método	59
III.	Determinação da pureza dos ácidos e do comprimento de onda máximo.....	61
IV.	Cálculo do Limite de quantificação e de detecção.....	67
V.	Cálculo da recuperação e doseamento dos ésteres no API.....	68
VI.	Linearidade do método analítico	71
VII.	Precisão resultados de ANOVA	75
VIII.	Robustez	77

Lista de Figuras

Figura 2.1 Estrutura da tetraciclina [3].....	4
Figura 2.3 Árvore de decisão da EMA para avaliação da aceitabilidade de impurezas genotóxicas, (adaptado de [5]).....	6
Figura 2.4 Alguns exemplos de alerta estrutural para grupos funcionais que são conhecidos por estarem envolvidos em reacções com o ADN [12].....	11
Figura 2.5 Categorização, qualificação e avaliação de riscos de impurezas, (adaptado de [12])	12
Figura 3.1 Representação de um HPLC, (adaptado de [17])	15
Figura 3.2 Representação da diferença entre precisão e exactidão, (adaptado de [21]).....	18
Figura 3.3 Factor de resposta relativo, (adaptado [23]).....	21
Figura 4.1 Reacção de síntese do diazometano.....	25
Figura 4.2 Reacção de esterificação de Fischer.....	25
Figura 4.3 Reacção geral de esterificação utilizando diazometano.....	25
Figura 5.1 Variação da concentração do éster 1 em função da concentração de fármaco...30	
Figura 5.2 Diagrama de Ishikawa para identificação da origem do problema.	30
Figura 5.3 Cromatograma do metanol p.a. sem filtrar.....	32
Figura 5.5 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S CA-GF92 (0,20µm).....	33
Figura 5.4 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro Millex-GN (0,20µm).	33
Figura 5.6 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro Chromafil (0,45µm).	33
Figura 5.7 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro AGILENT (0,45µm).....	34
Figura 5.8 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S RC-GF51 (0,45µm).....	34
Figura 5.9 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S CA-GF92 (0,45µm).....	34
Figura 5.10 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no S&S RC-GF92-TG100 (0,45µm).....	35
Figura 5.11 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S PTFE-TG100 (0,45µm).....	35
Figura 5.12 Cromatograma do API filtrado com o filtro Millex-GN (0,45µm).....	35
Figura 5.13 Cromatograma do API sem filtração.....	36
Figura 5.14 Estabilidade dos ésteres padrão e <i>in situ</i>	37
Figura 5.15 Cromatograma do ácido 1 + ácido 2 e éster 1+éster 2 (<i>in situ</i>).....	38
Figura 5.16 Cromatograma dos ésteres <i>in situ</i> , analisados na mesma amostra.....	41
Figura 5.17 Resultados experimentais (área dos picos cromatográficos vs concentração) regressão linear para o éster 1 padrão.....	43
Figura 5.18 Gráfico dos resíduos da recta de calibração para o éster 1 padrão.....	43
Figura 5.19 Resultados experimentais (área dos picos cromatográficos vs concentração) regressão linear para o éster 1 (<i>in situ</i>).....	43

Figura 5.20 Gráfico dos resíduos da recta de calibração para o éster 1 (<i>in situ</i>).....	43
Figura 5.21 Resultados experimentais (área dos picos cromatográficos vs concentração) regressão linear para o éster 2 (<i>in situ</i>).....	43
Figura 5.22 Gráfico dos resíduos da recta de calibração para o éster 2 (<i>in situ</i>).....	43
Figura III.1 Cromatograma e espectro do ácido 1.....	63
Figura III.2 Cromatograma e espectro do éster 1 <i>in situ</i>	63
Figura III.3 Cromatograma e espectro do éster 1 padrão.....	63
Figura III.4 Cromatograma e espectro do ácido 2.....	64
Figura III.5 Cromatograma e espectro do éster 2 <i>in situ</i>	64
Figura III.6 Cromatograma e espectro do metanol p.a.....	64
Figura III.7 Cromatograma e espectro da solução etérea de diazometano em metanol p.a.	65

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Recomendações dos limites aceites pela U.S. FDA e EMA para impurezas genotóxicas em produtos farmacêuticos para estudos clínicos, (adaptado de [11]).....	7
Tabela 3.1 Características de validação tendo em conta os tipos de procedimentos analíticos, ICH 2005, (adaptado [21]).....	16
Tabela 4.1 Parâmetros do método cromatográfico HPLC-UV.....	23
Tabela 4.2 Preparação das soluções de trabalho.....	26
Tabela 5.1 Características dos filtros utilizados para os testes a diferentes filtros.....	32
Tabela 5.2 Tempos de retenção para os compostos de interesse.....	37
Tabela 5.3 LQ e LD calculados para período de tempo equivalente a 20 vezes a largura a meia altura USP2010.....	39
Tabela 5.4 LQ e LD calculados para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura USP2011.....	40
Tabela 5.5 Resultados para o teste de recuperação.....	41
Tabela 5.6 Resultados do teste da resolução para os ésteres <i>in situ</i>	42
Tabela 5.7 Incertezas associadas aos parâmetros da regressão.....	42
Tabela 5.8 Resultados de ANOVA para a média do quadrado (MQ) da regressão e dos resíduos.....	44
Tabela 5.9 Resumo dos resultados obtidos para a linearidade dos ésteres.....	45
Tabela 5.10 Tabela dos resultados para o LQ e LD.....	45
Tabela 5.11 Resultados para a sensibilidade dos ésteres.....	46
Tabela 5.12 Análise da recuperação para cada éster.....	46
Tabela 5.13 Resultados para a análise da precisão para cada éster.....	47
Tabela 5.14 Resultados do teste de ANOVA.....	47
Tabela 5.15 Resumo dos factores de correcção.....	48
Tabela II.1 Condições testadas para desenvolvimento do método analítico.....	60
Tabela III.1 Dados para os ácidos e ésteres.....	62
Tabela V.1 Resultados mais detalhados para o parâmetro da exactidão.....	69
Tabela VI.1 Parâmetros de linearidade para o éster 1 padrão.....	71
Tabela VI.2 Parâmetros de linearidade para o éster 1 <i>in situ</i>	71
Tabela VI.3 Parâmetros de linearidade para o éster 2 <i>in situ</i>	71
Tabela VI.4 Dados de ANOVA da regressão linear para o éster 1 padrão.....	72
Tabela VI.5 Dados de ANOVA da regressão linear para o éster 1 <i>in situ</i>	72
Tabela VI.6 Dados de ANOVA da regressão linear para o éster 2 <i>in situ</i>	72
Tabela VII.1 Resultados de ANOVA para a precisão intermédia do éster 1 padrão.....	75

Tabela VII.2 Resultados de ANOVA para a precisão intermédia do éster 1 <i>in situ</i>	75
Tabela VII.3 Resultados de ANOVA para a precisão intermédia do éster 2 <i>in situ</i>	75
Tabela VIII.1 Tabela de análise dos resultados para o teste de Youden.	77

Nomenclatura e Acrónimos

AA	Agente Alquilante
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
API	Active Pharmaceutical Ingredients (Ingrediente activo farmacêutico)
CA	Acetato de celulose
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i> (Comité para os Produtos Médicos para Uso Humano)
CTC	Clorotetraciclina
Diazald	N-metil-N-nitroso-p-toluenosulfanamida
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europeia dos Medicamentos)
FC	Factor de correcção (Eq. 3.13)
FDA	U.S. Food & Drug Administration
GC	Cromatografia Gasosa
GI	Genotoxic impurities (Impurezas genotóxicas)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferência internacional de harmonização)
K	Coeficiente de distribuição partição do soluto
k'	Factor de retenção (Eq. 3.4)
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de detecção (Eq. 3.10, mg/mL)
LQ	Limite de quantificação (Eq. 3.9, mg/mL)
m	Declive da curva de calibração
NOEL/UF	No Observed Effect Level/Uncertainty Factor (Nível de efeitos não observados /Factor de Incerteza)
PDE	Permitted Daily Exposure (exposição permitida por dia) (mg/dia)
PGI	Potential Genotoxic impurities (Impurezas genotóxicas potenciais)
PhRMA	Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (Investigadores e Produtores Farmacêuticos dos Estados Unidos da América)
RELACRE	<i>Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal</i>
RF	Factor de resposta (Eq. 3.12, adimensional)
RRF	Factor de resposta relativa (Eq. 3.11, adimensional)
R _s	Resolução (Eq. 3.5)
RSD	Relative standard deviation (desvio padrão residual)(%)
SAR	Structure Activity Relationships (Relação estrutura actividade)
SFC	Cromatografia Supercrítica
S/N	Sinal/Ruído (Eq. 3.8, adimensional)
S _n	Variância na amostra n (Eq. 3.7, unidades de concentração)
TC	Tetraciclina
t _r	Tempo de retenção (min)
t ₀	Tempo de retenção de um composto que não é retido (min)
TTC	Threshold of Toxicological Concern, (µg/dia)
UV	Detector de Ultra-Violeta
W	Largura da base do pico (cm)
V _m	Volume da fase móvel (Eq. 3.5, mL)

V_r	Volume de retenção (Eq. 3.2, mL)
V_s	Volume da fase estacionária (Eq. 3.2, mL)
V_0	Volume de um composto que não é retido (Eq. 3.4, mL)

Símbolos gregos

α	Selectividade (Eq. 3.3)
σ	Desvio padrão
λ	Comprimento de onda (nm)

1. Enquadramento e Objectivos

Impurezas genotóxicas (GI) são compostos químicos, conhecidos ou suspeitos de serem mutagénicos e/ou cancerígenos, que podem actuar directamente no ADN (ácido desoxirribonucleico) ou nas enzimas envolvidas na sua replicação. É comum os ingredientes activos farmacêuticos (APIs) conterem quantidades vestigiais de impurezas resultantes de resíduos, subprodutos ou intermediários. Em particular, os ácidos são intermediários frequentemente utilizados na indústria química como contra-íões, catalisadores ácidos ou protector de remoção de grupo durante o processo de síntese.

Nos últimos anos as impurezas genotóxicas tornaram-se um assunto de grande preocupação para a indústria farmacêutica e suas entidades reguladoras. Por este motivo têm sido publicados várias guias de orientação com o objectivo de regulamentar este tipo de impurezas. No entanto, ainda são escassas as orientações específicas para impurezas genotóxicas, existindo assim uma lacuna que deverá ser colmatada dentro em breve. Nesta perspectiva, a CIPAN além de estar empenhada em cumprir todas as exigências regulamentares, pretende também dar um passo em frente no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a análise de GIs em APIs.

A proposta deste trabalho foi a validação de um método HPLC-UV (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta) para determinação de impurezas genotóxicas num API. Com este trabalho provou-se ser possível esterificar *in situ* ácidos e obter os respectivos ésteres, detectá-los e quantificá-los usando a cromatografia líquida, HPLC, com detector ultra-violeta.

Esta dissertação está dividida em 6 secções que descrevem o trabalho desenvolvido do seguinte modo: No capítulo 2 descreve-se brevemente a família de antibióticos em análise e as impurezas genotóxicas, passando pelas guias de orientação e a sua classificação. No capítulo 3 faz-se uma breve descrição do método cromatográfico e os parâmetros para a validação de métodos analíticos. No capítulo 4 descreve-se o plano de trabalho e as três fases em que foi desenvolvido. Concretamente, a primeira fase onde reproduziu-se as condições do método cromatográfico desenvolvido anteriormente no laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN, a segunda fase em que se optimizou e pré-validou alguns parâmetros e na terceira fase efectuaram-se os testes dos parâmetros da validação do método. No capítulo 5 apresentam-se os resultados e faz-se a sua discussão e no capítulo 6 são apresentadas as conclusões deste trabalho.

2. Introdução

Neste capítulo, faz-se uma breve descrição da empresa onde foi feito o estágio, da família de antibióticos em análise e do que são impurezas genotóxicas. Posteriormente é apresentada a técnica de análise e os parâmetros para validação de um método analítico.

2.1. AtralCipan

ATRALCIPAN, um grupo químico-farmacêutico Português com origem em 1947, cresceu ao longo dos anos sendo hoje formado por sete empresas com diferentes áreas de competência tecnológica. O grupo ATRALCIPAN procura uma posição de liderança no fabrico e na comercialização de produtos acabados e de princípios activos para a indústria farmacêutica, sendo o lema do grupo *"A acção é o princípio do conhecimento"* (S. Basílio)[1].

A CIPAN, Companhia Industrial Produtora de Antibióticos, S.A., é a empresa do grupo responsável pela produção de princípios activos (API, active pharmaceutical ingredients) para a indústria farmacêutica, com especial destaque para o fabrico de antibióticos. A produção iniciou-se em 1963 com a inauguração do complexo fabril Cipan na Vala do Carregado, Castanheira do Ribatejo. Em 1987 a CIPAN produzia 12 antibióticos diferentes, 8 por fermentação e 4 por semi-síntese, para além de outros intermediários.

As vendas da CIPAN são essencialmente para o estrangeiro, mais de 95%, sendo 84% para o continente Americano, pelo que tantos os produtos da CIPAN como as instalações são aprovados regularmente pela FDA (U.S. Food and Drug Administration), desde 1965 [1].

2.2. Tetraciclinas

As tetraciclinas são um grupo de antibióticos utilizado no tratamento de infecções bacterianas. O nome tetraciclina (TC) ou tetraceno, deriva do seu núcleo naftaceno, conjunto de quatro anéis aromáticos [2], como se representa na Figura 2.1.

O primeiro composto das tetraciclinas, Clorotetraciclina (CTC) foi descoberto em 1945 por Benjamin Duggar, durante a triagem sistemática de amostras de solo para identificação de microrganismos produtores de antibióticos. Este foi o primeiro passo para a obtenção de uma vasta gama de novas tetraciclinas obtidas como produtos naturais ou como produtos semi-sintéticos, no período entre 1945 e 1970 [2].

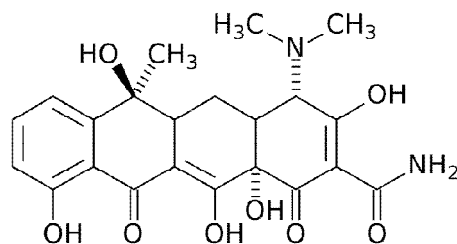


Figura 2.1 Estrutura da tetraciclina [3].

A primeira geração de tetraciclinas, que inclui a clortetraciclina, a oxitetraciclina, o cloridrato de tetraciclina e a dimetil-clortetraciclina, introduzida em 1951, foi largamente utilizada no tratamento da acne. As tetraciclinas de segunda geração, tais como a doxiciclina e a limeciclina, são substâncias semi-sintéticas com tempo de meia-vida maiores, melhor actividade antibacteriana e menor toxicidade [2].

As tetraciclinas têm um amplo espectro de actividade contra uma vasta gama de organismos gram-positivos e gram-negativos. Algumas propriedades características das tetraciclinas, como por exemplo amplo espectro de acção, baixa toxicidade, baixo custo, facilidade de administração e adequação para uso humano e uso animal, colocam as TC entre os antibióticos mais utilizados a nível mundial [3].

As tetraciclinas são frequentemente utilizadas para infecções do foro respiratório, tais como bronquite, pneumonia e gripe, brucelose, feridas e sepsis pós-operatória, entre outras. Devido ao seu uso abusivo é comum o desenvolvimento de resistência de um grupo variado de bactérias às tetraciclinas, principalmente às de primeira geração, o que tem impulsionado os estudos para o desenvolvimento de novos membros da família das tetraciclinas. [2].

2.3. Impurezas Genotóxicas

Impurezas genotóxicas (GIs) são compostos químicos que podem actuar sobre o material genético (ADN ácido desoxirribonucleico) de um modo desejável ou indesejável. As GIs são aceitáveis como APIs específicos e utilizadas, por exemplo, como agentes quimioterapêuticos. No entanto, na grande maioria dos casos a presença de GIs é inaceitável, sendo aconselhável fazer todos os esforços para removê-las ou evitar a sua formação, cumprindo os limites legais em vigor [4].

A definição de genotoxicidade é ampla e inclui tanto efeitos directos como efeitos indirectos. Por exemplo, existem evidências de que as substâncias genotóxicas se podem ligar directamente ao material genético o que se pode classificar com o efeito directo. Por outro lado, podem actuar sobre as enzimas envolvidas na replicação do ADN. Neste contexto, genotoxicidade é um termo que engloba efeitos de mutagenicidade através da

reactividade com o ADN, causando danos no ADN ou danos cromossómicos, quebras cromossómicas estruturais ou aneuploidias [4].

A garantia de que os produtos farmacêuticos são seguros é a principal responsabilidade dos produtores, independentemente dos produtos serem destinados à comercialização ou à investigação clínica. Deve-se dar particular atenção à qualidade e à pureza das matérias-primas utilizadas na formulação, especialmente dos ingredientes farmacêuticos activos (API), existindo uma enorme pressão para eliminar ou reduzir os níveis de impurezas no produto final. Por outro lado, a síntese de um API é geralmente uma síntese complexa e composta de várias etapas, nas quais podem formar-se subprodutos ou produtos intermediários com propriedades genotóxicas [4, 5].

Assim, os fármacos podem conter impurezas em concentrações muito baixas, provenientes das matérias-primas, subprodutos ou produtos intermediários, geradas na síntese, conhecidas ou suspeitas de serem mutagénicas e/ou cancerígenas. A presença de vestígios destas impurezas pode ser problemática para o produtor farmacêutico e leva ao desenvolvimento de métodos analíticos adequados, isto é, com a necessária sensibilidade, selectividade e robustez [4].

Alguns autores [6] afirmam que a maioria dos reagentes ou intermediários genotóxicos presentes em quatro ou mais passos da síntese, antes do isolamento/purificação do API, são susceptíveis de serem desactivados. No entanto, esta opinião não é consensual e existem vários argumentos que justificam a realização de análises quantitativas ao API ou intermediários para se garantir a ausência de potenciais impurezas genotóxicas [7].

2.3.1.Regulamentação

Existem directrizes internacionais relativas à presença de impurezas em medicamentos, mas não são específicas para GIs. Para preencher esta lacuna, as agências reguladoras e a indústria farmacêutica têm tentado equilibrar o que é tecnicamente viável e cientificamente necessário para diminuir os riscos de potenciais impurezas genotóxicas PGI (potentially genotoxic impurities)[5].

As entidades americanas reguladoras do sector farmacêutico, a FDA e a PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America), publicaram guias de orientação para regulamentar impurezas no geral. A EMA (European Medicines Agency) e o CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) têm actualmente orientações específicas para impurezas genotóxicas, apresentando-se na Figura 2.3 a proposta da EMA para avaliação de impurezas genotóxicas. No entanto, as agências reguladoras nalguns casos importantes têm recomendações que diferem ou fornecem informação pouco clara [8].

Na impossibilidade de definir um nível seguro de exposição (conceito do risco zero) para agentes genotóxicos cancerígenos e com a percepção de que a eliminação total das impurezas em APIs é muitas vezes inatingível, implementou-se um conceito de risco aceitável. O TTC, (threshold of toxicological concern) foi definido com base numa estimativa da exposição diária humana abaixo da qual o risco para a saúde é desprezável. Este conceito foi definido com base na análise de 730 compostos para se definir a carcinogenicidade ou potencial cancerígeno, isto é, o valor baseado na exposição humana ao pior caso de genotoxicidade. Daqui resultaram limites bastante reduzidos e que já estão aplicados aos produtos no mercado [5, 9].

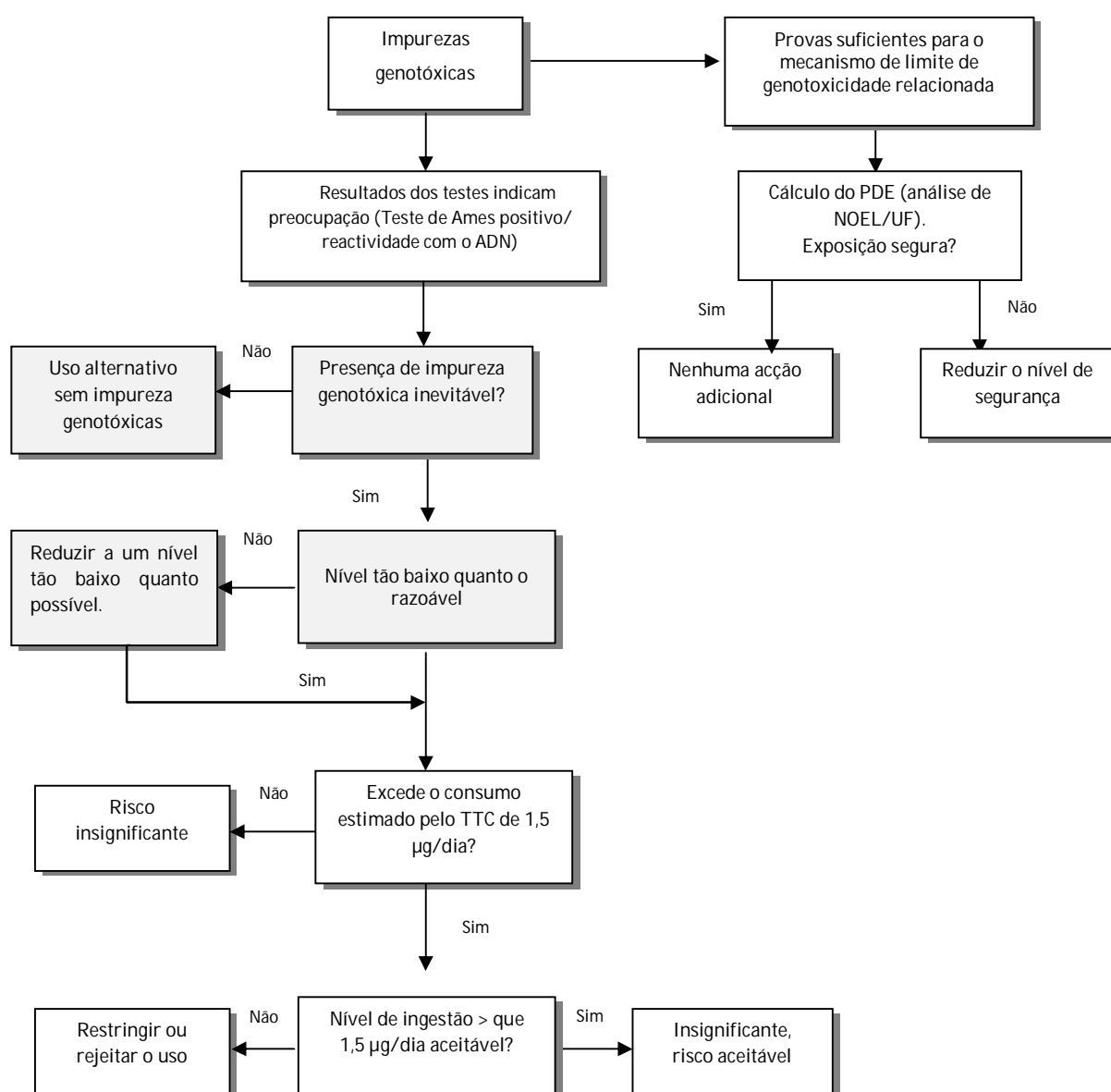


Figura 2.2 Árvore de decisão da EMA para avaliação da aceitabilidade de impurezas genotóxicas, (adaptado de [5]).

A concentração limite de impurezas genotóxicas nos fármacos é calculada com base na dose diária de toma utilizando a equação 2.1 [10]:

$$\text{Limite de concentração (ppm)} = \frac{\text{TTC } [\mu\text{g}/\text{dia}]}{\text{dose}[\text{g}/\text{dia}]} \quad (2.1)$$

Em 2004 a PhRMA estabeleceu que a exposição a GIs deve ser inferior a 1,5 µg / dia, o que representa um risco de cancro de 1 num milhão ao longo da vida. Este nível não se aplica aos agentes cancerígenos mais potentes, com limites de segurança adequados, ou compostos para os quais os limites não estão definidos. Para estes os níveis devem ser guiados pela política de controlo ALARP “tão baixos quanto razoavelmente possível” [5]. As recomendações para impurezas genotóxicas permitidas em produtos farmacêuticos, de acordo com o tempo de dosagem, são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Recomendações dos limites aceites pela U.S. FDA e EMA para impurezas genotóxicas em produtos farmacêuticos para estudos clínicos, (adaptado de [11]).

Limites TTC correspondentes à duração da dosagem						
Limite de controlo (µg/dia)	120	60	20	10	5	1.5
Duração (US FDA)	< 14 dias	14 dias a 1 mês	1-3 meses	3-6 meses	6–12 meses	>12 meses
Duração (EMA)	1 dia	≤ 1 mês	≤ 3 meses	≤6 meses	≤1 meses	>12 meses

O ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) é um projecto em que autoridades governamentais (da Europa, Estados Unidos e Japão) e especialistas da indústria farmacêutica tentam uniformizar as orientações existentes quanto aos requisitos técnicos para fármacos destinados a humanos. Neste trabalho vão ser seguidas as orientações do ICH [8].

O quadro geral de testes para avaliação da genotoxicidade em fármacos está estabelecido no ICH em duas directrizes de segurança: ICH S2A, 1995; ICH S2B, 1997. A directriz ICH S2B, que descreve o conjunto de testes para identificação de genotoxicidade no fármaco, consiste em [12]:

- i. Um teste de mutação de genes em bactérias.

* ALARP= “as low as reasonable practicable”

- ii. Um teste *in vitro* com a avaliação citogenética de cromossomas, danos em células de mamíferos *in vitro* ou teste de linfoma de rato.
- iii. Um teste *in vivo* de danos cromossómicos em células de roedores.

Nas directrizes de segurança do ICH (S2A e S2B) afirma-se: “Compostos com resultados negativos para os três testes padrão, realizados e avaliados em conformidade com as recomendações, geralmente fornecem um nível suficiente de segurança para demonstrar a ausência de actividade para genotoxicidade”. Compostos que produzam resultados positivos, num ou mais testes padrão, são considerados como genotóxicos mas podem ser exigidos testes adicionais para avaliação do risco [12].

Como ainda não existe consenso ou orientações definitivas para as impurezas genotóxicas, bem como para os limites aceitáveis, o ICH recomenda que sejam seguidas as orientações da qualidade para impurezas no geral, Q3. As orientações para avaliação de impurezas, ICH Q3A(R2) e Q3B(R2), fornecem orientações para identificação de impurezas mas não dão qualquer orientação quanto aos níveis de aceitabilidade. Descrevem os limites acima dos quais as impurezas em geral devem ser referidas, identificadas e qualificadas, quer nas investigações toxicológicas ou clínicas, mas não fazem referência a GIs especificamente [12, 13]. Numa tentativa de regulamentar as impurezas genotóxicas em fármacos o ICH, no comité de 9 de Junho de 2010, propôs uma nova orientação, M7: “Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk”.

2.3.2. Classificação de impurezas

As impurezas, de uma forma geral, estão classificadas e qualificadas na orientação ICH Q3A(R2) nas seguintes classes:

- Impurezas orgânicas (processo e API)
- Impurezas inorgânicas
- Solventes residuais

Na secção das impurezas orgânicas não se faz qualquer referência às impurezas genotóxicas em particular. Refere-se que a quantificação da impureza no geral deve ser analisada, tanto para impurezas conhecidas como para impurezas desconhecidas, que devem estar num limite controlado e inferior ao estabelecido [14].

Apesar de nas orientações do ICH não se fazer qualquer referência à classificação de GIs, na orientação em desenvolvimento ICH M7 [8], pretende-se uniformizar todas as orientações existentes para GIs e avaliar a relação estrutura-actividade (SAR, structure activity relationships). Com base nesta relação, *Muller et al* [12] e *Dobo et al.* [13]

propuseram classificações de impurezas genotóxicas que são recomendados pelos organismos EMA, FDA e PhRMA [10].

Muller et al [12] propõem três passos para a classificação das GI's numa de cinco classes propostas, tanto para publicações de científicas como para testes de genotoxicidade. A classificação baseada em dados da análise estrutural comparativa para identificação de grupos funcionais que estejam relacionados com grupos mutagénicos, ainda que recente, é seguida por vários outros autores e sendo adoptada neste trabalho [10, 12]. Metodologia de *Muller et al* [12] para classificação de GIs:

Passo 1: Identificação dos alertas estruturais para composto semelhantes ou impurezas conhecidas (identificação estrutural ou facilmente previsível), e classificação das impurezas numa das cinco classes.

Passo 2: Estabelecimento de uma estratégia de qualificação para as impurezas com base na classificação por classes de acordo com *Muller et al* [12].

Passo 3: Estabelecimento de limites aceitáveis da impureza no API, baseado na ingestão diária admissível e no TTC.

Classe 1- Neste grupo incluem-se agentes cancerígenos com um mecanismo genotóxico conhecido e resultados comprovados em animais e humanos. Existem dados publicados sobre a estrutura química do composto que demonstram a natureza genotóxica da impureza.

Classe 2- Neste grupo incluem-se as impurezas com mutagenicidade demonstrada com base em testes convencionais de genotoxicidade, mas cujo potencial carcinogénico é desconhecido.

Classe 3- Neste grupo incluem-se as impurezas com grupos funcionais cuja estrutura molecular pode estar relacionada com genotoxicidade, mas que não tenham sido testadas isoladamente. A identificação destes compostos baseia-se no conhecimento da estrutura baseado em sistemas especializados em relações estrutura-actividade. O grupo funcional "em alerta" não se encontra na matéria-prima do API. Sendo introduzidos no processo por alguns dos compostos conhecidos "em alerta" e reconhecidos pela sua reactividade com o ADN, ou seja, actividade mutagénica. Alguns destes compostos estão representados na Figura 2.4.

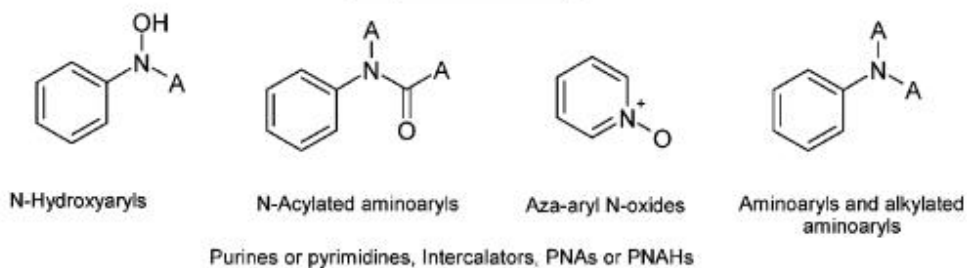
Classe 4- Neste grupo incluem-se as impurezas que contêm um alerta para o grupo funcional, que é compartilhado com a matéria-prima. A genotoxicidade da impureza isolada é desconhecida, mas a genotoxicidade do princípio activo tem sido caracterizada através de testes de genotoxicidade convencionais. Existem restrições químicas e de ambiente químico tanto para a impureza como para o API.

Classe 5- Neste grupo incluem-se as estruturas sem nenhum “alerta” para as quais não existem provas suficientes para admitir ausência de genotoxicidade. Este grupo é coberto nas orientações ICH Q3A (R), Q3B (R) e Q3C.

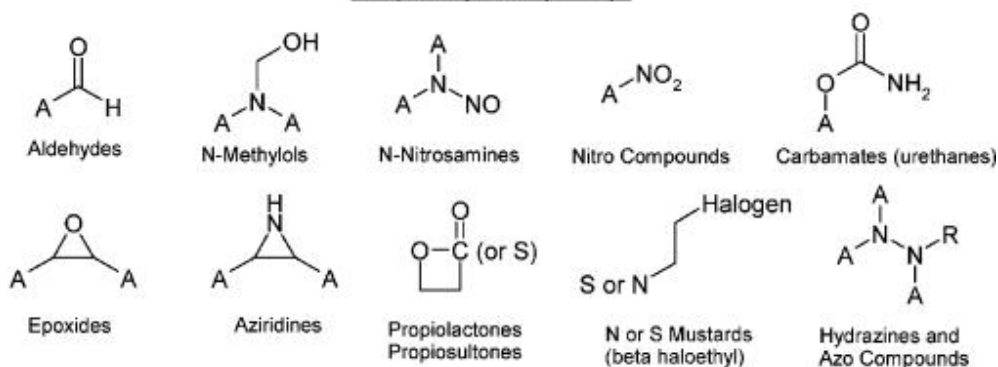
Este sistema de classificação é utilizado exclusivamente com a finalidade de decidir se uma impureza possui um nível elevado de risco e, portanto, deve ser controlada em níveis muito baixos de ingestão diária. Assim, esta classificação não é uma classificação geral de genotoxicidade, mas uma tentativa de identificação de grupos funcionais com potencial genotóxico e mutagénico. Com base na classificação apresentada os mesmos autores sugerem um procedimento de avaliação das impurezas como o que se representa na Figura 2.5 [10, 12, 15].

A classificação de impurezas com base na SAR (relação estrutura actividade) não é ainda exacta. Devido à incerteza dos alertas estruturais, a regulamentação não deve ser baseada unicamente na presença de um determinado grupo funcional, devendo-se aprofundar a análise aos compostos, constrangimentos estruturais, ambiente químico ou dados experimentais na avaliação do potencial de genotoxicidade [12].

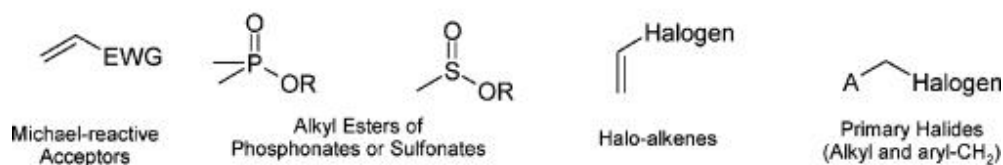
Group 1: Aromatic Groups



Group 2: Alkyl and Aryl Groups



Group 3: Heteroatomic Groups



A = alkyl, aryl or H

Halogen = F, Cl, Br, I

EWG = electron withdrawing group (CN, C=O, ester, etc)

Figura 2.3 Alguns exemplos de alerta estrutural para grupos funcionais que são conhecidos por estarem envolvidos em reacções com o ADN [12].

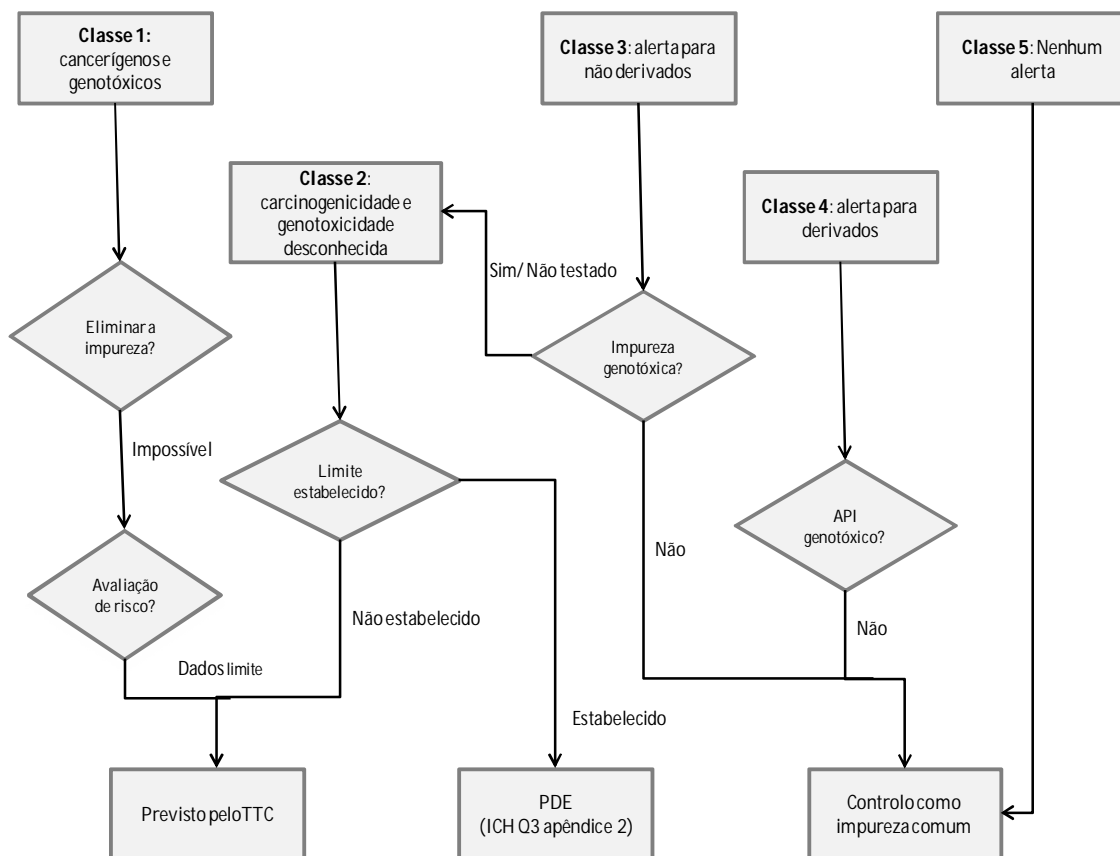


Figura 2.4 Categorização, qualificação e avaliação de riscos de impurezas, (adaptado de [12])

3. Métodos analíticos e sua validação

A cromatografia é uma técnica de separação poderosa e versátil que viabiliza análise quantitativa dos componentes individuais presentes numa mistura, num único procedimento analítico. A cromatografia inclui um conjunto de métodos de separação em que os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária, sólida ou líquida, com grande área superficial; uma fase móvel, um fluido. A separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, como consequência das diferentes interações com a fase estacionária [16].

A cromatografia pode ser dividida em três classes de acordo com a natureza da fase móvel: cromatografia gasosa (GC) quando é utilizado um gás como fase móvel; cromatografia líquida (LC) quando se utiliza líquido como fase móvel; cromatografia supercrítica (SFC) quando a fase móvel é um fluido supercrítico [16].

O método utilizado para a realização deste trabalho é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), pelo que será descrito com maior detalhe, apresentando-se na Figura 3.1 um diagrama do equipamento.

Na cromatografia líquida a amostra é homogeneamente distribuída no topo de uma coluna, contendo um enchimento sólido, usando uma micro-seringa ou uma válvula de injeção. A fase móvel é forçada a percolar a coluna por uma acção externa, que pode ser a força da gravidade (cromatografia de baixa pressão) ou uma força mais intensa gerada por uma bomba (cromatografia de alta pressão), de modo a superar a resistência ao escoamento da fase móvel. No processo de percolação os componentes migram com velocidades diferentes em função da afinidade com a fase estacionária e são detectados à saída da coluna para diferentes instantes. O registo contínuo do sinal do detector em função do tempo, cromatograma, fornece informação sobre a composição da amostra. Os detectores mais usados são os fotométricos (UV), de fluorescência e de índice de refração (IR) [17].

Os detectores de ultra violeta (UV), devido à sua versatilidade, fiabilidade, sensibilidade e custo relativamente baixo, são os mais utilizados. A detecção depende da presença de um grupo cromóforo havendo uma relação entre a concentração da amostra e a absorvância [equação de Lambert-Beer]. A maioria dos compostos, com uma ou mais ligações duplas absorve luz UV numa gama de 2000Å a 3500Å. Para estes compostos convém escolher um comprimento de onda (λ) próximo do comprimento de onda máximo, isto é o λ a que a absorção é máximo [18].

O enchimento da coluna cromatográfica, fase estacionária, é constituído por partículas porosas. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, denomina-se de

cromatografia líquida de fase normal, sendo os adsorventes mais utilizados a sílica e a alumina. Quando a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente, o processo é denominado de cromatografia líquida de fase reversa. Neste caso os adsorventes são substâncias polares quimicamente ligadas, tendo como grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino e outros e os eluentes mais utilizados são a água, o metanol e o acetonitrilo [17].

As moléculas de soluto transportadas pela fase móvel têm tempos de retenção diferentes de acordo com a afinidade com a fase estacionária. Para que dois solutos sejam separados devem ser retidos na coluna durante tempos diferentes. Define-se tempo de retenção, t_r , como o tempo que decorre entre a injeção e o tempo em que ocorre o máximo de concentração do pico eluído. Os compostos que não interagem com a coluna são eluídos no tempo, t_0 , o tempo de passagem do solvente [19]. A eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser medida pelo número de pratos teóricos (N), calculado com base no tempo de retenção e no desvio padrão do pico Gaussiano (σ) pela Equação 3.1.

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad (3.1)$$

O volume de retenção, (V_r), é o volume de solvente requerido para eluir o soluto estando relacionado com o tempo de retenção (t_r), o volume da fase móvel (V_m) e o volume da fase estacionária (V_s) pela Equação 3.2.

$$V_r = t_r \times f = V_m + (K \times V_s) \quad (3.2)$$

onde f é o caudal e K o coeficiente de partição do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária [19].

A capacidade de separação de dois componentes (A e B) pode ser expressa pelo factor de separação ou selectividade (α), definida como a razão entre os factores de retenção (k') de dois solutos diferentes pela Equação 3.3 [19].

$$\alpha = \frac{k'(A)}{k'(B)} \quad (3.3)$$

onde k' pode ser calculado a partir do tempo de retenção ou volume de retenção desde que o caudal de eluente seja constante, pela Equação 3.4.

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{(V_r - V_0)}{V_0} \quad (3.4)$$

onde t_0 e V_0 representam o tempo e o volume de retenção de um composto que não é retido.

Define-se também o factor de resolução (R_s , Equação 3.5) em função da diferença dos tempos de retenção (t_r^A e t_r^B) e da largura da base dos picos de dois componentes (W^A e W^B) em unidades de tempo [19].

$$R_s = \frac{2x(t_r^B - t_r^A)}{(W^A + W^B)} \quad (3.5)$$

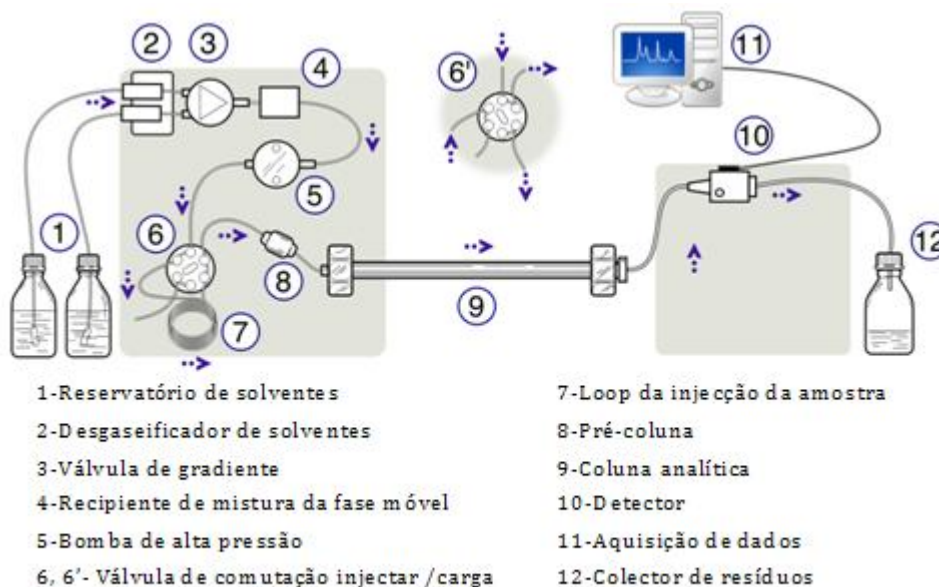


Figura 3.1 Representação de um HPLC, (adaptado de [17]).

3.1. Validação de Métodos Analíticos

A Conferência Internacional de Harmonização (ICH), reúne as entidades reguladoras da indústria farmacêutica da Europa, Japão e EUA. Criada em 1990 tem como missão garantir o desenvolvimento e registo de medicamentos mais seguros, eficazes e de alta qualidade.

Na indústria farmacêutica a validação de métodos é parte essencial ao desenvolvimento e caracterização de fármacos, sendo regulamentada pelo ICH em orientações específicas para a qualidade. A validação de métodos analíticos inclui a identificação e quantificação de impurezas, classificando-se os procedimentos analíticos mais comuns do seguinte modo [10, 20]:

- Testes de identificação;
- Testes quantitativos de impurezas;
- Testes de limite quantitativo de impurezas;
- Testes quantitativos da fracção activa na amostra do fármaco, no medicamento ou noutros componentes no fármaco;

O conjunto de parâmetros necessários para validar um método é apresentado na Tabela 3.1 e será detalhado nos pontos seguintes.

Tabela 3.1 Características de validação tendo em conta os tipos de procedimentos analíticos, ICH 2005, (adaptado [21]).

Característica	Procedimento Analítico			
	Identificação	Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Limite	
Especificidade	Sim	Sim	Sim	Sim
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Exactidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão				
Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermédia / Reprodutibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo de Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Limite de detecção	Não	Não*	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não

Sim: normalmente avaliado; Não: normalmente não avaliado

*pode ser necessário em alguns casos

3.1.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade do método para detectar de forma inequívoca a presença de componentes, mesmo na presença de interferentes que podem ser produtos de degradação, a matriz da amostra ou brancos. O método deve ser capaz de diferenciar entre o analito de interesse e compostos com estrutura química similar, se presentes, podendo ser avaliado por um ou mais processos de análise de modo a garantir o nível desejado de especificidade. Para procedimentos cromatográficos deve-se utilizar cromatogramas representativos dos componentes a analisar [10, 20].

Salienta-se que na literatura é comum confundir os termos, especificidade e selectividade. Para a maioria das organizações reguladoras a especificidade é considerada como o último “grau da selectividade” embora existam organizações que fazem uma distinção clara entre ambos os conceitos. Neste trabalho vai ser utilizado o termo especificidade como definido pelo ICH e pela EMA [10, 20].

3.1.2.Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade, dentro de um determinado intervalo, para ter respostas do detector que são directamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Idealmente a linearidade deve ser estabelecida entre 50% a 150% dos limites da recomendação do ICH para a concentração nominal da amostra de fármaco. Esta pode ser demonstrada directamente sobre a substância activa, por diluição de uma solução padrão e/ou em pesagens separadas dos componentes do produto [10, 20].

Como critério de aceitação a linearidade deve ser avaliada graficamente, por exemplo, representando a área do pico vs concentração. Se a linearidade existir os resultados devem ser quantificados através do coeficiente de correlação da regressão, ordenada na origem (ponto de intercepção com o eixo dos yy) e soma dos quadrados dos resíduos num mínimo de cinco concentrações analisadas.[10, 20].

A sensibilidade avalia a capacidade do método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Quando a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da recta. A sensibilidade representa-se pela Equação 3.6 [22]:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (3.6)$$

onde (ΔL) é o quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração (ΔC) correspondente aquele acréscimo.

3.1.3.Exactidão

A exactidão de um procedimento analítico expressa a concordância entre o valor verdadeiro, ou valor de referência, e o valor encontrado. A exactidão deve ser avaliada num intervalo adequado ao processo analítico e realizada em amostras fortificadas com quantidades conhecidas de impurezas. Nos casos em que é impossível obter amostras de impurezas ou produtos de degradação, é aceitável a comparação com resultados obtidos por um procedimento independente [10, 20].

3.1.4.Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de coerência (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de uma mesma amostra homogénea ou se tal não for possível através de amostras preparadas a partir de uma

solução da amostra. A precisão de um procedimento analítico é expressa através da variância e do desvio padrão de uma série de medições[10, 20] .

Existem três níveis que podem ser considerados para avaliar a precisão: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade [10, 20]. Na Figura 3.2 representa-se a diferença entre a precisão e a exactidão.

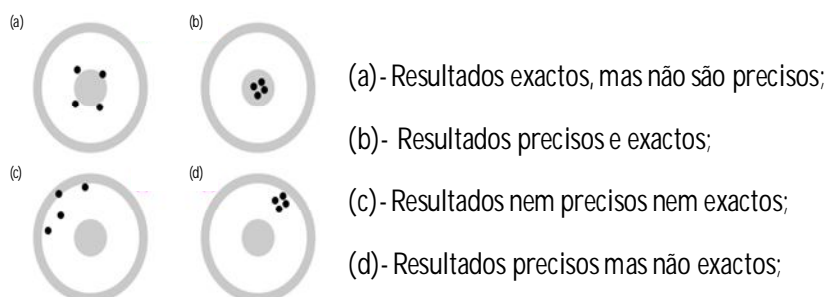


Figura 3.2 Representação da diferença entre precisão e exactidão, (adaptado de [21]).

3.1.4.1. Repetibilidade

Repetibilidade, ou precisão intra-ensaio, expressa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais ao longo de um curto intervalo de tempo. Deve ser determinada por múltiplas réplicas da mesma amostra, um mínimo de nove, abrangendo o intervalo especificado para o processo (por exemplo, 3 concentrações x 3 repetições cada). Alternativamente pode ser avaliada num mínimo de 6 determinações a 100% da concentração da amostra [10, 20].

3.1.4.2. Precisão Intermédia

A precisão intermédia expressa as variações intra-laboratório. Determina a precisão do método em diferentes amostras com diferentes analistas e/ou diferentes configurações do equipamento [10, 20].

3.1.4.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade expressa a precisão inter-laboratórios. É utilizada para normalização de metodologias, normalmente para inclusão de procedimentos em farmacopeias. Este é um parâmetro de validação opcional onde os dados são obtidos durante a transferência de métodos entre laboratórios [10, 20].

3.1.5. Intervalo de linearidade

O intervalo de linearidade de um método analítico provém de estudos ao analito, dentro e nos extremos do intervalo onde foi demonstrado que o procedimento tem um nível adequado de precisão, exactidão e linearidade. Para determinação de impurezas

deve-se estabelecer um limite de 80% a 120% do limite especificidade estabelecido [10, 20].

O teste de homogeneidade de variâncias, teste PG, avalia se existem diferenças significativas entre as variâncias nos limites da gama de trabalho (S_1^2 e S_n^2). Este teste estatístico compara o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher (95%) com o valor PG calculado pela Equação 3.7 [22].

$$PG = \frac{S_1^2}{S_n^2} \quad (3.7)$$

Comparando os valores calculados se $PG \leq F$ a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada. Por outro lado se $PG > F$ a diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho deverá ser reduzida [22].

3.1.6.Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O limite de quantificação (LQ) de um processo de análise é a menor concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente numa amostra, com a precisão e exactidão adequadas. O limite de quantificação é um parâmetro para determinar baixa concentração e é usado principalmente para a determinação de impurezas ou produtos de degradação [10, 20].

O limite de detecção (LD) do processo de análise é a menor concentração de analito que pode ser detectada numa amostra, mas não é necessariamente quantificada com rigor [10, 20]. São várias as abordagens para determinar os limites de quantificação e detecção:

-Avaliação visual

É utilizada principalmente para métodos não instrumentais mas também pode ser utilizada para métodos instrumentais. Tanto o limite de detecção como o limite de quantificação são determinados pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e onde é estabelecido o nível mínimo em que o analito pode ser detectado ou quantificado, respectivamente, por exemplo, compostos que fluorescem sob a luz UV na cromatografia em camada delgada[10, 20].

-Razão Sinal/Ruído (S/N)

Esta abordagem só pode ser aplicada a procedimentos analíticos que apresentem ruído na linha de base. A determinação cromatográfica da relação sinal / ruído (S/N), Equação 3.8, é calculada comparando-se o sinal obtido para a amostra do analito com o sinal da amostra do branco e determinando-se a concentração mínima a partir da qual o analito pode ser quantificado ou detectado com fiabilidade. Tipicamente a relação S/N é aceitável

quando para o limite de quantificação é 10:1 ($S/N \geq 10$) e para o limite de detecção é 3:1 ($S/N \geq 3$) [10, 20].

$$S/N = \frac{2 \times H}{h} \quad (3.8)$$

Em que H é a altura do pico do analito (cm) medido no cromatograma a partir do máximo do pico e extrapolado ao sinal da linha de base observado a uma distância igual a 5 vezes a largura do pico a meia altura. E h é o ruído do cromatograma do sinal da amostra do branco, observado ao longo de uma distância igual a 5 vezes a largura do pico a meia altura [21].

-Análise do desvio padrão

Esta abordagem é baseada no desvio padrão da resposta, σ , podendo calcular-se o limite de quantificação e o limite de detecção pelas Equações 3.9 e 3.10 respectivamente:

$$LQ = \frac{10 \sigma}{m} \quad (3.9)$$

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{m} \quad (3.10)$$

onde σ é o desvio padrão da resposta (mL/mg) e m o declive da recta de calibração (mL/mg), LQ é o limite de quantificação (mg/mL) e LD é o limite de detecção (mg/mL).

3.1.7. Robustez

A robustez de um procedimento analítico demonstra a sua capacidade para permanecer inalterado por efeito de pequenas e deliberadas variações dos parâmetros do método. Fornece uma indicação da fiabilidade durante a utilização, isto é avalia se o método não é afectado por alterações típicas do procedimento experimental. Se as medições forem afectadas por variações das condições devem ser registadas as precauções para procedimento [10, 20].

Para avaliar a robustez deve-se testar uma série de parâmetros de adequação do sistema de modo a assegurar-se a validade do procedimento analítico sempre que for usado [10, 20]. Exemplos de variações típicas em cromatografia líquida são:

- Estabilidade das soluções ao longo do tempo;
- Influência de pequenas variações na composição e ou pH da fase móvel;
- Temperatura;

3.2. Factor de Resposta Relativo

O factor de resposta relativo é um método bastante utilizado na indústria farmacêutica, que diminui consideravelmente o tempo necessário para análise de rotina das amostras.

O factor de resposta relativo (RRF) é utilizado para corrigir as diferenças na resposta relativa entre substâncias numa amostra de fármaco, sendo obtido pela Equação 3.11 [23].

$$RRF = \frac{RF(\text{relacionada})}{RF(\text{ })} \quad (3.11)$$

onde o factor de resposta (RF) é definido como a resposta (do fármaco ou substância relacionada) por unidade de peso e que pode ser calculada pela Equação 3.12 [23].

$$RF = \frac{\text{Resposta (respectivas unidades)}}{c \text{ (mg/mL)}} \quad (3.12)$$

Se as curvas de calibração forem definidas por um modelo linear pode-se calcular RRF por comparação entre os declives das equações como se representa na Equação 3.13 [23].

$$RRF = \frac{\text{declive (relacionada)}}{\text{declive ()}} \quad (3.13)$$

O factor de correcção (CF) está definido pela Equação 3.14.

$$CF = \frac{1}{RRF} \quad (3.14)$$

Na Figura 3.3 representa-se a forma gráfica como se pode calcular a relação factor de resposta por comparação das rectas de calibração [23].

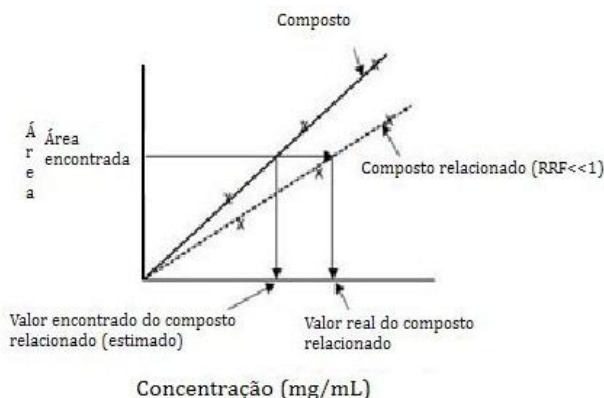


Figura 3.3 Factor de resposta relativo, (adaptado [23]).

4. Plano de Trabalho e Procedimentos

Este capítulo incide sobre os procedimentos experimentais desenvolvidos, fazendo-se ainda referência a materiais, equipamentos e técnicas laboratoriais. O cronograma de estágio está apresentado no Anexo I.

4.1. Condições do método

Na Tabela 4.1 estão descritos os parâmetros do método cromatográfico desenvolvido na CIPAN para a detecção de ésteres eventualmente presentes no API. Os procedimentos usados no desenvolvimento do método analítico incluindo a selecção do melhor comprimento de onda para análise de soluções dos ácidos, ésteres e brancos são descritos nos Anexo II e III.

Tabela 4.1 Parâmetros do método cromatográfico HPLC-UV.

Parâmetros do Método	Descrição
Técnica	Cromatografia Líquida (HPLC-UV)
Equipamento	AGILENT 1100
Coluna	Coluna C8 (5µm) Comprimento: 250 mm Diâmetro: 4,6 mm
Modo	Isocrático
Fluxo	1.5 mL/min
Detector UV (λ)	226 nm
Solvente para dissolução de amostras	Metanol
Fase móvel	50% da solução A e 50% da solução B
Solução A	0,1% (v/v) de ácido ortofosfórico em água
Solução B	0,1%(v/v) de ácido ortofosfórico em solução aquosa de acetonitrilo (80%)
Volume de injeção	20 µl
Temperatura da coluna	45°C
Tempo de corrida	20 min
Temperatura auto-sampler	5°C

4.2. Materiais, Reagentes e Equipamento

Para além do material volumétrico corrente (pipetas e balões), foram utilizados “vials” com as respectivas tampas septadas da Agilent HP. O cromatógrafo HPLC-UV (Agilent-1100), era composto de bomba quaternária, tabuleiro de solventes, injector automático, forno para a coluna e um detector UV de duplo feixe com lâmpada de deutério, Agilent.

Os solventes utilizados para preparação da fase móvel e dissolução das amostras foram: ácido ortofosfórico (Merck, pureza: $\geq 85\%$), acetonitrilo (Fisher Scientific e Fisher Chemical pureza: 99,99%), metanol (VWR BDH Prolabo, pureza: 99,8%) e água ultra-pura (Milli-Q). Todas as amostras e soluções da fase móvel foram desgaseificadas no banho de ultra sons (Bandelin Sonorex), antes de analisadas no HPLC.

Para a preparação da solução do diazometano foram utilizados: Diazald (Sigma Aldrich®, pureza: 99%), éter dietílico (Panreac, pureza: 99,7%), KOH (Merck, pureza: $\geq 88\%$), água desmineralizada (RIOs 5) e etanol (destilaria CIPAN, pureza: 96%).

A utilização de todos os reagentes foi precedida da consulta das respectivas fichas de segurança (MSDS).

4.2.1.Preparação da fase móvel

Preparou-se a solução A, 0,1% (v/v) de ácido ortofosfórico em água, num balão de 1000mL adicionando 1mL de H_3PO_4 e perfazendo-se o volume com água ultra-pura.

Preparou-se a solução B, 0,1% (v/v) de ácido ortofosfórico em solução aquosa de acetonitrilo (ACN) em água ultra-pura 80% (v/v). Colocando, num balão de 1000mL, 1mL de H_3PO_4 e perfazendo-se o volume com uma solução aquosa de ACN 80% (v/v). Agitou-se (agitador magnético) a solução durante alguns minutos, deixou-se repousar de um dia para o outro e determinou-se o pH.

4.2.2.Preparação do diazometano

Para obtenção dos ésteres dos ácidos *in situ* preparou-se uma solução etérea de diazometano pelo seguinte procedimento [24].

Pesou-se cerca de 10g de Diazald® (pesado directamente no balão de destilação) e adicionou-se 100 ml de éter dietílico com agitação permanente (agitador magnético) até se dissolver totalmente. Arrefeceu-se a solução de Diazald® a 0°C e adicionou-se muito lentamente uma solução etanólica de KOH (2,0g de KOH; 8,0ml de H_2O e 80ml de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Deixou-se a repousar alguns minutos e destilou-se colocando num banho de água a 40-55°C, sempre com agitação. O frasco de recolha, isento de esmerilados e devidamente protegido da luz, estava imerso num banho de gelo. Desligou-se o aquecimento assim que a solução de Diazald® no balão de destilação perdeu a cor amarela característica. Os vestígios de diazometano no balão de destilação foram destruídos com 6mL de ácido acético. Verificou-se o pH do resíduo no balão com fita indicadora de pH. Guardou-se a solução de diazometano no frio (-5°C).

A Figura 4.1 representa a reacção de síntese do diazometano

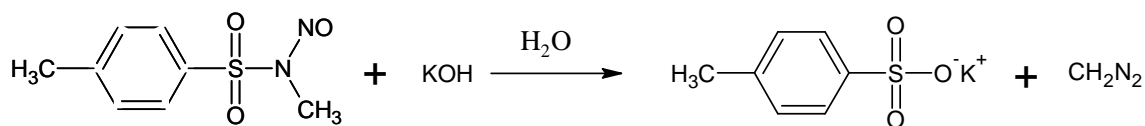


Figura 4.1 Reacção de síntese do diazometano.

4.3. Esterificação *in situ*

A síntese clássica de um éster, esterificação de Fischer, envolve a reacção de um ácido com um álcool, Figura 4.2. A reacção é lenta (a temperatura ambiente) e reversível podendo usar-se um ácido como catalisador. À escala laboratorial, os ácidos podem ser esterificados utilizando métodos alternativos, por exemplo a esterificação utilizando diazometano, Figura 4.3.

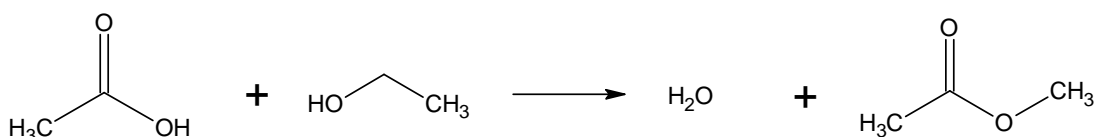


Figura 4.2 Reacção de esterificação de Fischer.

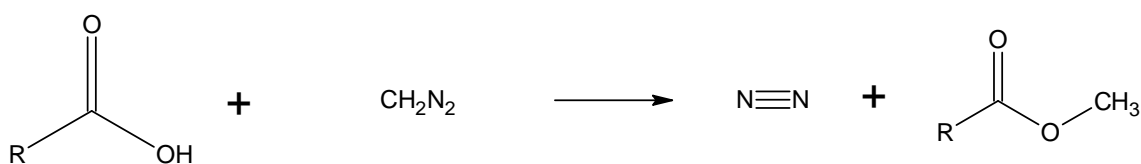


Figura 4.3 Reacção geral de esterificação utilizando diazometano.

Neste trabalho preparam-se os ésteres dos ácidos metílicos, ácido 1 e ácido 2 *in situ* por esterificação com excesso de diazometano. Para tal, num copo de 25 mL pesou-se 5mg do ácido adicionou-se 3mL de metanol p. a. e colocou-se sob agitação magnética durante alguns minutos. Após dissolução do ácido adicionou-se, gradualmente, com uma pipeta de Pasteur, aproximadamente 4mL de solução de diazometano. Visualmente detecta-se o fim da reacção quando a cor da solução no copo permanece amarela e cessa a libertação de bolhas de gás (azoto).

Os ésteres obtidos por este procedimento de esterificação são designados, éster 1 *in situ* e éster 2 *in situ*.

4.4. Preparação e diluição das soluções

As soluções dos ésteres (padrão ou *in situ*) para análise no HPLC foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento:

1. Solução *stock* concentrada dos ésteres 0,5mg/mL em metanol p.a.
-Para o éster padrão pesaram-se cerca 5,0mg para um balão aferido de 10mL e perfez-se o volume com metanol p.a.
-Para os ésteres *in situ*, seguiu-se o procedimento descrito em 4.3, transferindo-se a solução para um balão aferido de 10mL e perfez-se o volume com metanol p.a.
2. Preparação da solução *stock* A, $1,0 \times 10^{-2}$ mg/mL por transferência com uma pipeta volumétrica de 1,0mL da solução *stock* 0,5 mg/mL para um balão aferido de 50mL, adicionando-se metanol p.a. para perfazer o volume.
3. Preparação da solução *stock* B, $1,0 \times 10^{-3}$ mg/mL, por transferência com uma pipeta volumétrica de 5,0mL da solução *stock* A para um balão aferido de 50mL, perfazendo-se com metanol p.a.
4. Preparação da solução *stock* C, $1,0 \times 10^{-4}$ mg/mL por transferência com uma pipeta volumétrica de 1mL da solução *stock* B para um balão aferido de 10mL, perfazendo-se com metanol p.a.

Na Tabela 4.2 apresentam-se os volumes utilizados para a preparação das soluções de trabalho, com concentrações entre $1,0 \times 10^{-5}$ mg/mL a $3,1 \times 10^{-4}$ mg/mL de cada um dos ésteres.

Tabela 4.2 Preparação das soluções de trabalho.

Volume transferido (mL)	Solução <i>stock</i>	Concentração final (mg/mL)
3,1	B	$3,1 \times 10^{-4}$
2,3	B	$2,3 \times 10^{-4}$
1,5	B	$1,5 \times 10^{-4}$
0,9	B	$9,0 \times 10^{-5}$
3,0	C	$3,0 \times 10^{-5}$
2,0	C	$2,0 \times 10^{-5}$
1,0	C	$1,0 \times 10^{-5}$

A concentração da solução amostra de fármaco foi definida de acordo com testes feitos para definição da quantidade de fármaco amostra, concretamente 300mg de fármaco num balão aferido de 10mL em metanol p.a.

4.5. Filtros

Durante a validação do método, após preparação das amostras para análise cromatográfica, procedeu-se à sua filtração como é usual em análises de HPLC. Este procedimento tem por finalidade a recuperação do analito da matriz, eliminando

substâncias que interferem na análise e que podem reduzir o tempo de vida das colunas. Conforme será descrito posteriormente a filtração interfere com os resultados do método analítico. Assim, optou-se por não filtrar as soluções em análise e proceder-se regularmente à lavagem da coluna e do equipamento com solventes.

5. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho são apresentados neste capítulo. Primeiro apresentam-se os resultados de contaminação das amostras pelos filtros, seguido dos resultados da reprodução das condições do método cromatográfico, estudos de optimização e pré-validação do método cromatográfico e finalmente os estudos de validação do método.

5.1. Filtros

Durante os testes de optimização e pré-validação sentiu-se a necessidade de avaliar se o fármaco em análise continha os ésteres que estavam na origem do desenvolvimento do método. Durante esta análise, pelo método descrito em 4.1 detectou-se a presença de, pelo menos um éster, o que discordava dos resultados prévios obtidos no laboratório e dos testes efectuados por uma entidade externa credenciada. Este resultado indicava que o método em validação permitia a detecção dos ésteres, mesmo em quantidades vestigiais. No entanto, após os cálculos de doseamento, verificou-se que os valores obtidos para o éster 1 eram superiores ao limite de especificação para os ésteres (7,5ppm). A gravidade destes resultados levou à suspensão dos trabalhos agendados e à análise crítica de todos os dados obtidos até à data, para se estabelecer uma relação entre os resultados da análise e dos ésteres eventualmente presentes no fármaco.

Numa primeira abordagem detectou-se que uma diminuição da concentração do fármaco indicava um aumento da concentração do éster sulfónico na solução, como se mostra na Figura 5.1. Durante um mês foram realizados vários testes ao fármaco e de um dia para o outro deixou de se detectar o éster 1, mesmo para lotes onde anteriormente tinha sido detectado. Para identificar a causa do problema várias hipóteses foram levantadas e descartadas à medida que os testes foram sendo efectuados. Na Figura 5.2 apresentam-se, sob forma de diagrama de causa efeito, todas as hipóteses colocadas.

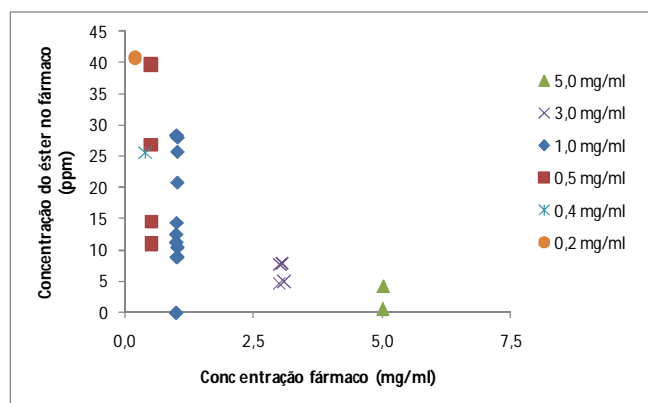


Figura 5.1 Variação da concentração do éster 1 em função da concentração de fármaco.

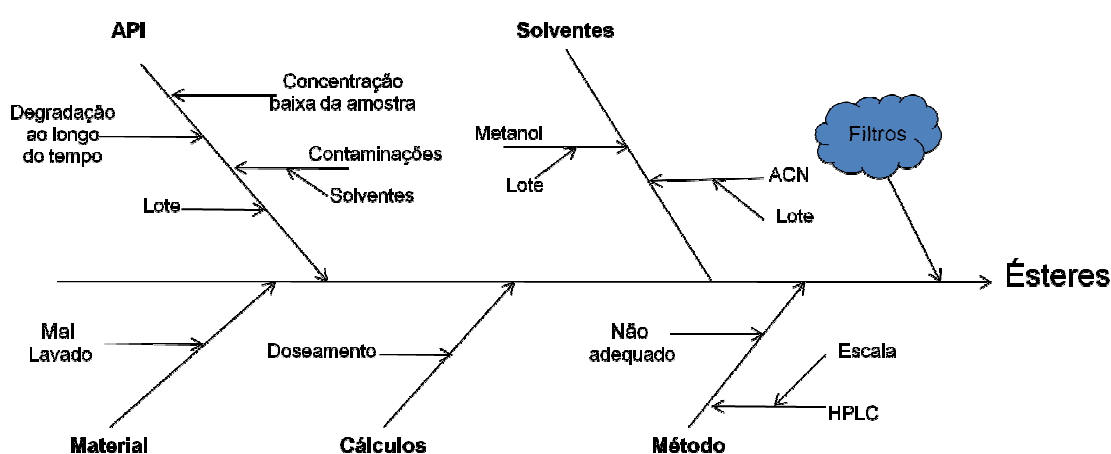


Figura 5.2 Diagrama de Ishikawa para identificação da origem do problema.

Todas as hipóteses e todos os testes efectuados para identificação da origem da contaminação são descritos a seguir.

Material de vidro

Esta foi a primeira hipótese que se pensou para a contaminação do fármaco. O material de vidro é reutilizado diariamente e apesar de todos os cuidados com a sua lavagem (na CIPAN há pessoal especializado nesta área) qualquer resíduo num balão ou vial poderia ser detectado por um método de análise para concentrações muito baixas. A hipótese de contaminação pelo material foi descartada, usando material do Laboratório de Controlo da Qualidade, próprio para a cromatografia gasosa, que tem uma lavagem mais cuidadosa.

Cálculos

O cálculo do doseamento foi outro dos pontos em que não havia concordância entre os valores obtidos e os valores expectáveis, de acordo com dados da análise ao fármaco por

entidades credenciadas. Esta discordância levou à revisão detalhada dos cálculos para o doseamento dos ésteres do fármaco em pó, obtendo-se mesmo assim valores acima do valor de especificação para o éster.

Solventes

Pelo facto de se pretenderem analisar vestígios, conseguem-se detectar pequenas variações no sinal de base nos cromatogramas dos solventes, que variam com o lote. Para o metanol usado como solvente das amostras e dos padrões, qualquer variação no sinal de base muito próximo ou mesmo sobreposto com o tempo de retenção de qualquer um dos ésteres faria com que os valores destes fossem influenciados. Após análise do metanol p.a. e de uma selecção prévia dos lotes que favoreciam a sua selectividade em relação ao sinal de base concluiu-se que o problema de contaminação não provinha dos solventes.

API

Apesar de ter à disposição vários lotes de fármaco, por uma questão de comodidade utilizava-se sempre o lote que estava disponível no laboratório. Suspeitou-se que a origem do problema poderia estar relacionada com os lotes e/ou com a possibilidade de contaminação ou degradação no laboratório, apesar de se saber que o fármaco é bastante estável ao longo do tempo. O fármaco foi testado em diferentes lotes, lotes no laboratório há vários dias e em soluções com diferentes concentrações para se averiguar como a variação da concentração afectava a quantidade de contaminação. Destes testes conclui-se que a contaminação nada tinha que ver com o API.

Método

Após várias tentativas fracassadas para identificar a origem do problema colocou-se em causa o próprio método, visto que não são conhecidos métodos HPLC-UV para doseamento destes ésteres no API. Apesar de estarmos a injectar soluções com concentrações residuais os resultados do doseamento, indicavam que a concentração era elevada, pelo que o método poderia não ser o mais apropriado para determinação de ésteres em API.

Os testes eram realizados diariamente, mas de um dia para o outro deixou de se verificar a contaminação, sem qualquer explicação aparente. A análise detalhada de todos os dados levou à desconfiança dos filtros. Apesar de bastante questionável esta poderia ser a resposta, pois a contaminação desapareceu exactamente após a troca de filtros no laboratório.

No laboratório, como são desenvolvidos novos produtos, por uma questão de segurança da coluna de HPLC todas as amostras injectadas são pré-filtradas usando filtros de acordo com as especificações. A análise de duas amostras do API, filtradas com filtros

de diferentes fornecedores proporcionou cromatogramas bastante diferentes. Após esta descoberta fez-se um estudo complementar com diferentes filtros como se descreve a seguir.

Filtros

Os diferentes filtros testados e as suas características estão descritos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Características dos filtros utilizados para os testes a diferentes filtros.

Marca	Tipo	Diâmetro (mm)	Porosidade (μm)	Lote
AGILENT	埴C	25	0,45	EW0369-1
Millex-GN	NL	13	0,20	R8JN05539
Chromafil	PET	25	0,45	0182
Schleicher & Schuell	RC-GF51	30	0,45	ED0368-1
Schleicher & Schuell	CA-GF92	30	0,45	DZ0490-1
Schleicher & Schuell	RC-GF92-TG100	30	0,45	EC0553-1
Schleicher & Schuell	CA-GF92	30	0,20	EA0413-1
Schleicher & Schuell	PTFE-TG100	30	0,45	DZ0022-1

Para teste dos filtros injectou-se no HPLC, pelo método descrito em 4.1, metanol p. a. sem filtrar e metanol p.a. filtrado por cada um dos filtros em teste. Cada amostra foi analisada 2 vezes consecutivas. Os resultados obtidos, cromatogramas[†], estão nas Figuras de 5.3 a 5.11. Procedeu-se de igual modo com uma solução do API, filtrada e não filtrada (ver Figuras 5.12 e 5.13).

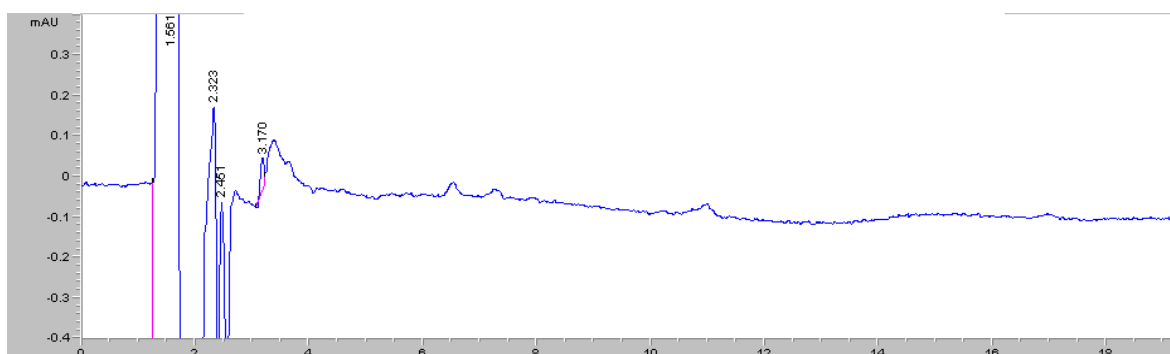


Figura 5.3 Cromatograma do metanol p.a. sem filtrar.

[†] Nos cromatogramas a intensidade da resposta é expressa em unidades arbitrárias (A.u.) e o tempo em minutos.

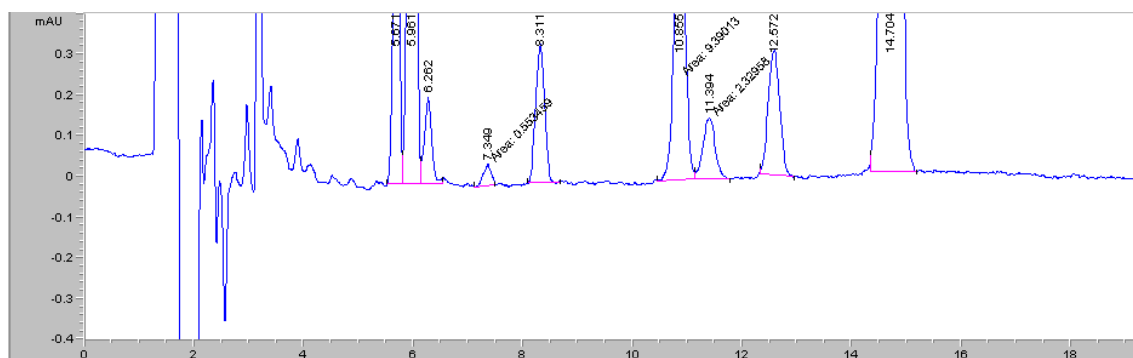


Figura 5.4 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro Millex-GN (0,20µm).

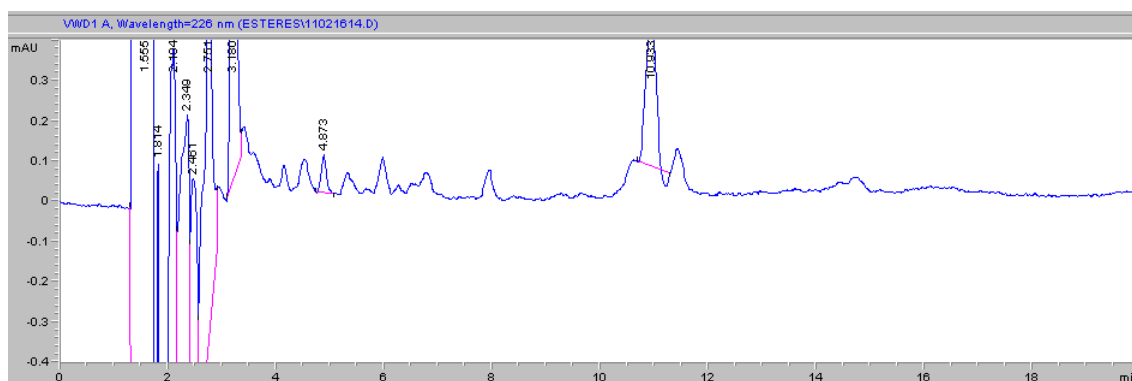


Figura 5.5 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S CA-GF92 (0,20µm).

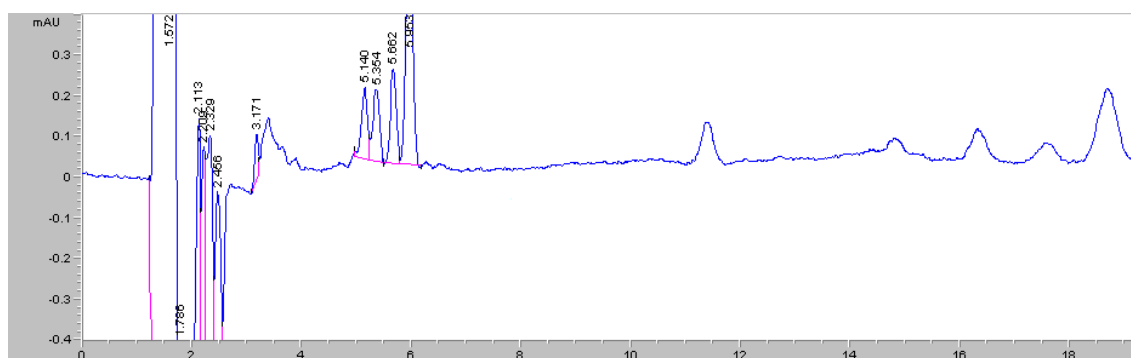


Figura 5.6 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro Chromafil (0,45µm).

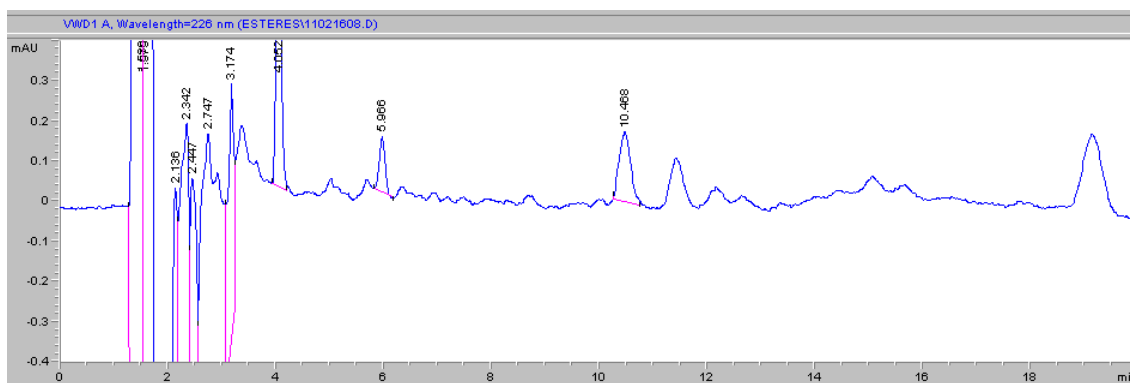


Figura 5.7 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro AGILENT (0,45µm).

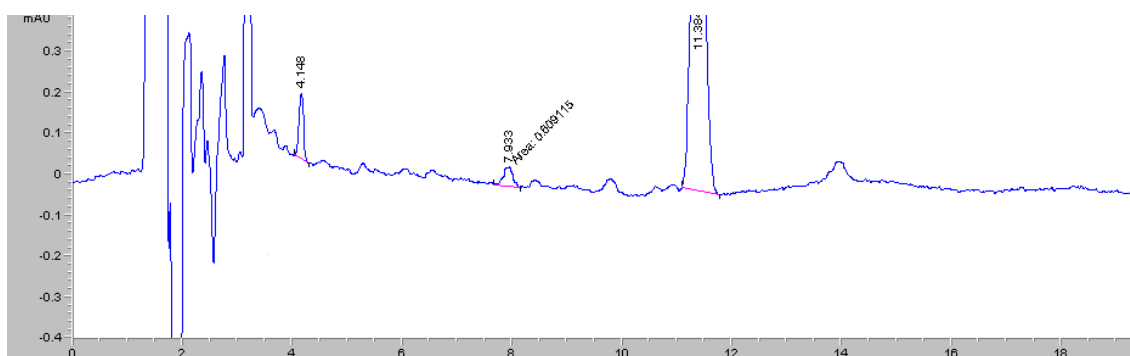


Figura 5.8 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S RC-GF51 (0,45µm).

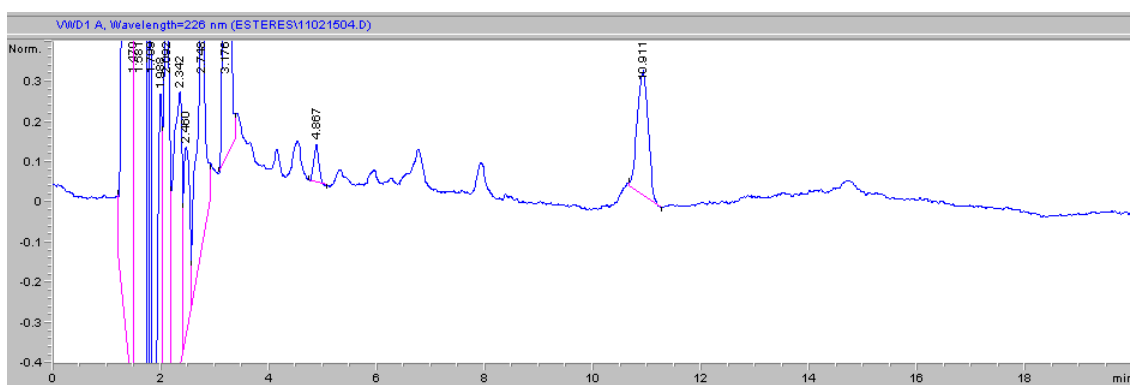


Figura 5.9 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S CA-GF92 (0,45µm).

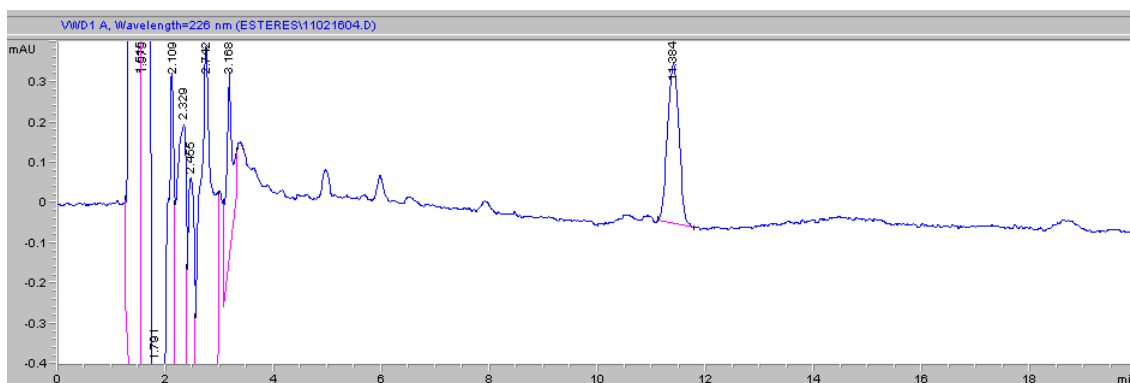


Figura 5.10 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no S&S RC-GF92-TG100 (0,45µm).

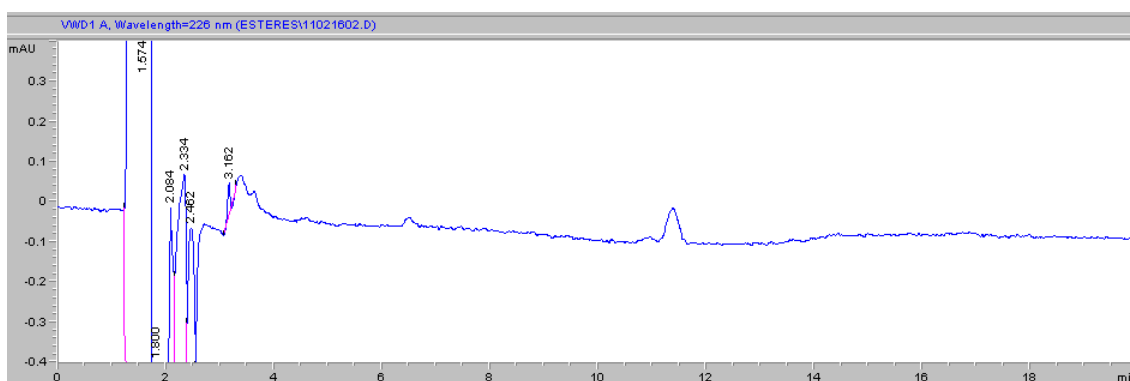


Figura 5.11 Cromatograma de metanol p.a. filtrado no filtro S&S PTFE-TG100 (0,45µm).

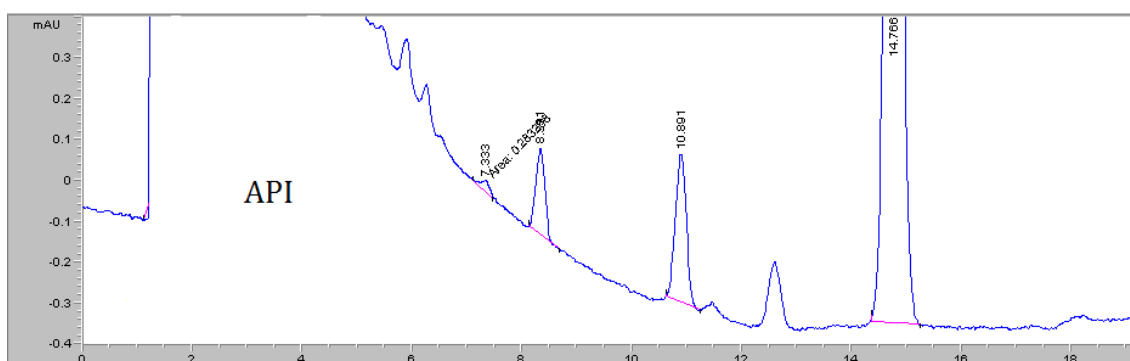


Figura 5.12 Cromatograma do API filtrado com o filtro Millex-GN (0,45µm).

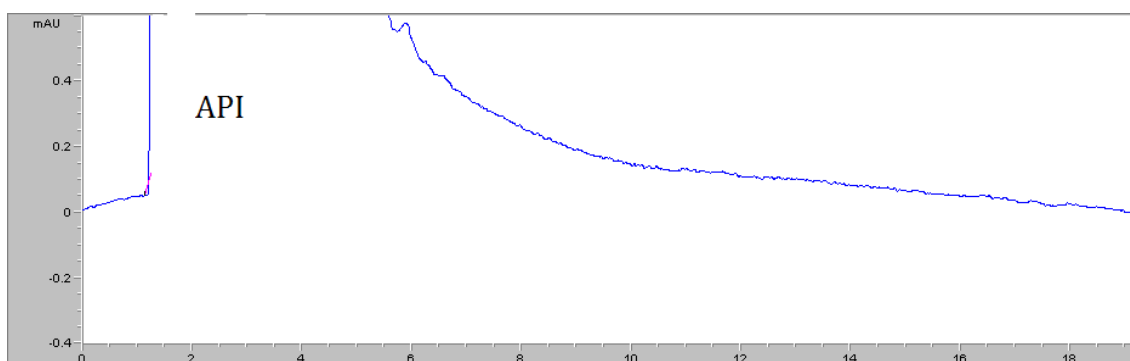


Figura 5.13 Cromatograma do API sem filtração.

A filtração das amostras antes da sua análise no HPLC-UV mostrou-se um procedimento pouco indicado para este método cromatográfico. Apesar de se terem testado vários filtros, adequados para solventes orgânicos, nenhum serviu o propósito. Assim optou-se por não filtrar nenhuma das amostras, não só por não ser possível, mas também porque a probabilidade das amostras em análise conterem resíduos que prejudiquem a coluna ou o equipamento é reduzida. De qualquer modo, como medida de precaução, ao longo do trabalho a coluna e o equipamento foram frequentemente lavados com solvente em concentrações adequadas.

Destaca-se que este trabalho teve como objectivo a análise de vestígios, sendo um método muito poderoso com capacidade de detecção na ordem dos ppm. Qualquer resíduo mesmo que em quantidades vestigiais seria detectado.

5.2. Reprodução das condições do método cromatográfico

Os ésteres em análise neste trabalho éster 1 (padrão e preparado *in situ*) e o éster 2 (preparado *in situ*) eventualmente presentes no API como produtos intermediários do processo. A utilização de ésteres padrão e *in situ* prendeu-se com a necessidade de analisar o éster 2, que não existe para compra. Por este motivo foi desenvolvido um procedimento interno de esterificação *in situ*, que era necessário validar no laboratório. Desta forma analisou-se o éster 1 (padrão e *in situ*) e determinaram-se os tempos de retenção em ambas as amostras para verificar se a reacção de esterificação *in situ* estava a conduzir a resultados concordantes. Após confirmação efectuou-se o procedimento de esterificação *in situ* para o ácido 2 e obteve-se o respectivo éster que depois de analisado permitiu identificar o tempo de retenção do éster 2 *in situ*.

Recorde-se que o éster 1 e o éster 2 foram preparados por esterificação do ácido 1 e ácido 2, respectivamente, com excesso de solução etérea de diazometano (de acordo com a técnica descrita em 4.3).

Usando as condições apresentadas na Tabela 4.1, procedeu-se à análise HPLC dos solventes, [metanol, água, diazometano + metanol (4:10) e éter + metanol (4:10)] para identificação e confirmação dos tempos de retenção. Posteriormente analisaram-se soluções aquosas e metanólicas dos ácidos 1 e 2 e dos respectivos ésteres em metanol p.a. Na Tabela 5.2 apresentam-se os tempos de retenção dos diferentes compostos analisados, sendo possível verificar a concordância dos tempos de retenção de ambas as amostras do éster 1 padrão e *in situ*.

Tabela 5.2 Tempos de retenção para os compostos de interesse.

Amostra	Tempo de Retenção (min) (solvente: Metanol)	Tempo de Retenção (min) (solvente: Água)
Metanol	1,5±0,1	---
Diazometano	2,3±0,1 e 2,4±0,1	---
Éter	3,2±0,1 e 12,4±0,1	---
Ácido 1	2,0±0,1	1,7±0,1
Ácido 2	1,9±0,1	1,8±0,1
Ácido 1 Padrão	7,3±0,1	---
Ácido 1 <i>in situ</i>	7,3±0,1	---
Ácido 2 <i>in situ</i>	8,4±0,1	---

Para testar a estabilidade das soluções dos ésteres repetiu-se a análise da mesma solução, éster 1 (padrão e *in situ*) e éster 2 *in situ* hora a hora num período de 4h. Com base nos resultados, apresentados na Figura 5.14 verificou-se que as soluções são estáveis, isto é a degradação das amostras não é significativa, embora se recomende que as amostras sejam preparadas e injectadas num curto espaço de tempo.

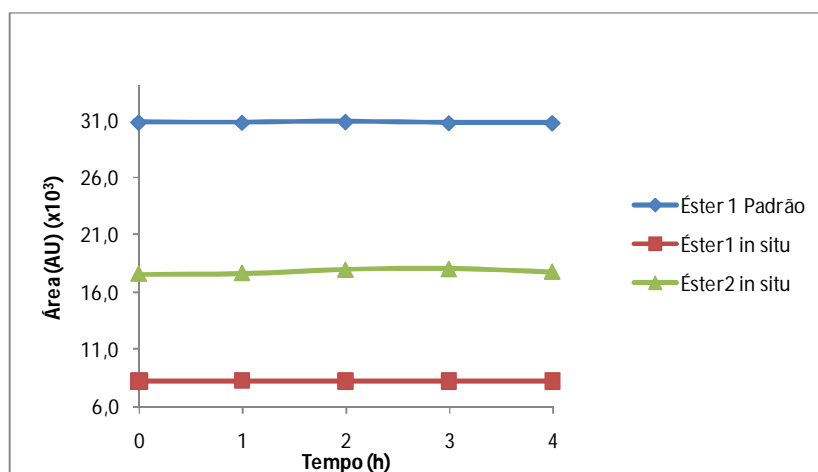


Figura 5.14 Estabilidade dos ésteres padrão e *in situ*.

O teste de variação de pH, caudal de fase móvel e volume de injeção teve como objectivo verificar quais as alterações sofridas no tempos de retenção pelos ácidos e ésteres face a estas perturbações.

Para os testes de pH analisou-se cada um dos ácidos dissolvido em metanol p.a., em concentração 0,4 mg/mL, ajustando-se o pH com um pequeno volume (5 gotas) de diferentes soluções concentradas: NaOH (concentração 5N), HCl (37%, Aldrich) e NH₄OH (32%, MERCK), para pH \approx 13, 2 e 10 respectivamente. Verificou-se que os tempos de retenção não se alteram significativamente com a alteração do pH ou seja a presença de outras formas iónicas dos ácidos não afecta a interacção com a fase estacionária.

Para o teste de variação de caudal e de volume da injeção, analisaram-se os ésteres padrão e *in situ* variando-se o caudal da fase móvel, de 1.5ml/min para 1.0 ml/min e o volume da injeção de 20 μ l, para 10 μ l e para 50 μ l. Com estes testes verificou-se que aumentando o volume de injeção aumentava a área dos picos cromatográficos das amostras, mas não se alterava o tempo de retenção. Diminuindo o caudal verifica-se uma alteração significativa do tempo de retenção, como seria expectável. Estas alterações não revelaram qualquer tipo de impurezas não desejadas que pudessem co-existir com os compostos em análise.

O último teste, desta fase do trabalho, teve como objectivo a verificação de possíveis interferências quando se analisa em simultâneo os ácidos 1 e 2 e os ésteres 1 e 2 *in situ*. Até esta fase do trabalho os compostos foram analisados isoladamente, mas a estarem presentes no fármaco, estes aparecerão em simultâneo na amostra. Verificou-se que para os ésteres não existe qualquer interferência significativa nos tempos de retenção, quando analisados em conjunto, como se representa na Figura 5.15. Estes dados foram analisados em diferentes dias e confirmam os resultados já obtidos anteriormente.

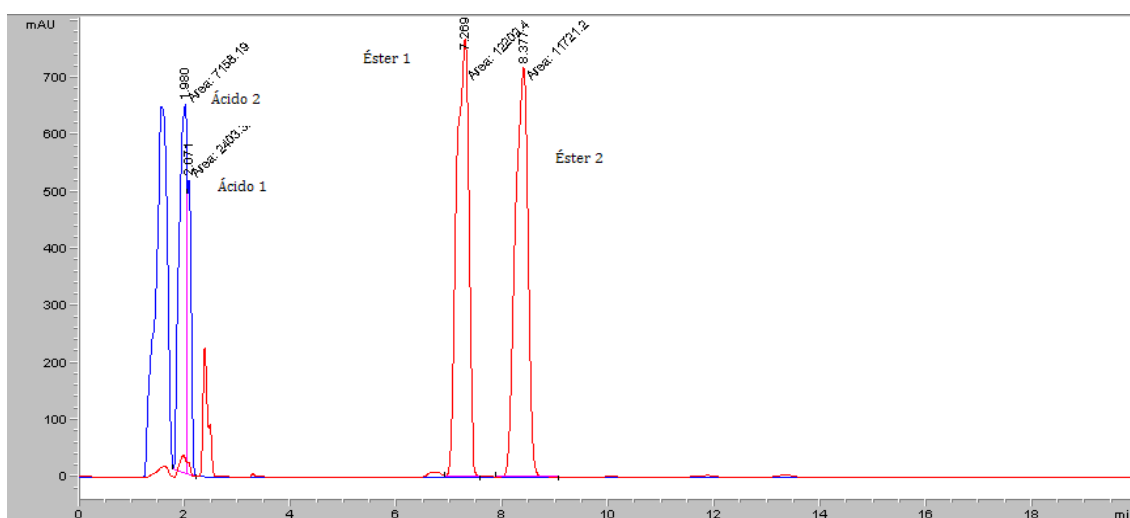


Figura 5.15 Cromatograma do ácido 1 + ácido 2 e éster 1+éster 2 (*in situ*).

5.3. Testes de optimização e pré-validação do método cromatográfico

Esta fase do trabalho teve como objectivo a definição dos critérios para a fase de validação, tais como, metodologias a seguir e procedimentos de cálculo.

Foram efectuadas as seguintes análises: limite de quantificação e detecção, para o éster 1 (padrão e *in situ*) e éster 2 (*in situ*); Identificação e quantificação dos ésteres no fármaco.

Numa primeira abordagem testaram-se os ésteres numa gama de baixa concentração; 1ppm, 5 ppm e 10ppm em solução. Este teste teve como objectivo verificar se o método desenvolvido permitia detectar os ésteres a baixas concentrações, num intervalo que incluísse o limite especificação (7.5 ppm). Verificou-se que nesta gama de concentrações o método detectava os ésteres.

Visto que o método detecta eficazmente os ésteres, num intervalo compreendendo o limite de especificação, diminuí-se sucessivamente a concentração dos ésteres para determinação dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) de cada um dos ésteres usando o método S/N (sinal/ruído). Para tal comparou-se o sinal obtido para o éster com o sinal de base do branco, (ver exemplo de cálculo no Anexo IV). A concentração equivalente ao LQ obtém-se para $S/N \geq 10$ e a concentração equivalente ao LD obtém-se para $S/N \geq 3$.

Na Tabela 5.3 encontram-se as concentrações do LQ e LD determinadas a partir do método do S/N com um período de tempo equivalente a 20 vezes a largura do pico a meia altura, tal como é expresso na versão da USP de 2010. Este valor foi revisto para um período de tempo equivalente a 5 vezes a largura do pico a meia altura com a entrada em vigor da versão 2011 da USP. Para se obter concentrações equivalentes ao LD e LQ mais baixas de optou-se por se adoptar a versão 2011 da USP e os novos valores para o LD e LQ encontram-se na Tabela 5.4.

Tabela 5.3 LQ e LD calculados para período de tempo equivalente a 20 vezes a largura a meia altura USP2010.

	LQ			LD	
Concentração (mg/mL)	$1,0 \times 10^{-04}$	$7,5 \times 10^{-05}$	$5,0 \times 10^{-05}$	$4,0 \times 10^{-05}$	$2,0 \times 10^{-05}$
Concentração equivalente na amostra (ppm)	3,3	2,5	1,7	1,3	0,67
Éster 1 padrão	16,00	12,34	7,56	6,59	3,33
Éster 1 in situ	13,50	10,40	8,96	5,64	3,00
Éster 2 in situ	18,55	14,44	10,29	8,32	4,50

Tabela 5.4 LQ e LD calculados para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura USP2011.

		LQ	LD
Concentração (mg/mL)	1,0x10 ⁻⁰⁴	2,0x10 ⁻⁰⁵	1,0x10 ⁻⁰⁵
Concentração equivalente na amostra (ppm)	3,3	0,67	0,33
Éster 1 padrão	74,00	13,35	6,36
Éster 1 <i>in situ</i>	62,75	19,70	10,58
Éster 2 <i>in situ</i>	69,67	14,18	8,00

Após determinação dos limites de quantificação e detecção analisou-se o API, pelo método desenvolvido, verificando a existência de picos no tempo de retenção dos ésteres. Foi nesta fase que se verificaram algumas dificuldades em dosear a concentração equivalente de ésteres no fármaco devido a problemas com a filtração das amostras tal como se discutiu em 5.1.

Variou-se a concentração do API entre 0,2 mg/mL e 50mg/mL, para se determinar a concentração mais apropriada para o método de validação, tendo-se seleccionado a melhor concentração de 30 mg/ml. Salienta-se que para a análise da amostra interessa ter concentrações tão elevadas quanto possível para demonstrar que o API não contém Glc em concentrações superiores à concentração equivalente ao limite de detecção.

Deste teste verificou-se que o API contém ésteres em concentrações inferiores ao limite de detecção, pelo que procedimento de validação requer a fortificação com os ésteres. Como tal adicionou-se à amostra de API quantidades variáveis e conhecidas de ésteres e determinou-se o seu doseamento (ver exemplo de cálculo do doseamento no Anexo V).

A linearidade, um dos parâmetros importantes para a validação do método, também foi analisada nos testes de pré-validação. A partir deste teste verificou-se, numa primeira avaliação, que o sinal dos ésteres é proporcional à sua concentração.

5.4. Validação do método cromatográfico

Após os testes prévios descritos na secção 5.2 e 5.3 que demonstram condições aceitáveis para prosseguir com a validação do método analítico, usando as condições de operação descritas na Tabela 4.1 efectuou-se a validação, parâmetro a parâmetro, cumprindo todos os critérios exigidos pelo ICH, USP e RELACRE (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal).

5.4.1. Especificidade

Um método diz-se específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias eventualmente presentes na amostra. A especificidade pode ser demonstrada por dois testes:

-o teste de recuperação do analito, em que se fortificou a amostra com concentrações conhecidas dos ésteres, deve verificar taxas de recuperação próximas de 100%. Os resultados são apresentados na Tabela 5.5 e permitem concluir que o método é específico e selectivo;

-o teste de resolução, obtido pela análise em HPLC de uma amostra contendo simultaneamente os ésteres 1 e 2 preparados *in situ*, deverá ter $R_s \geq 1,5$. Pela análise da Figura 5.16 e da Tabela 5.6 permitiu concluir que existe uma boa separação, não havendo interferência entre os dois ésteres em estudo.

Tabela 5.5 Resultados para o teste de recuperação.

Recuperação		Recuperação do método
Éster 1 Padrão	100,6 %	98,00%
Éster 1 <i>in situ</i>	96,71 %	
Éster 2 <i>in situ</i>	96,70%	

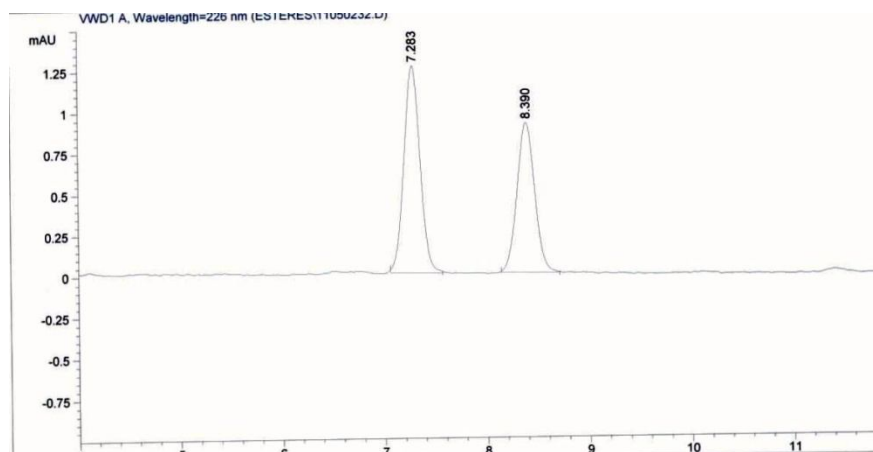


Figura 5.16 Cromatograma dos ésteres *in situ*, analisados na mesma amostra.

A especificidade e a selectividade podem ainda ser demonstradas pelo número de pratos teóricos (N, Equação 3.1), medida da eficiência da coluna cromatográfica e pelo factor de separação (α , Equação 3.3), indicativo da separação dos compostos. Na Tabela 5.6 encontram-se os resultados destes parâmetros obtidos computacionalmente.

Como se pode verificar $R_s=3,69$ o que indica que existe uma boa separação dos componentes da amostra, o valor da selectividade indica uma boa separação dos compostos, idealmente $\alpha>1$, e o número de pratos teóricos, entre 10000 e 20000 indica uma boa eficiência da coluna cromatográfica. A partir destes resultados pode-se verificar que o método é selectivo e específico.

Tabela 5.6 Resultados do teste da resolução para os ésteres *in situ*.

Éster	N	α	R_s
Éster 1 <i>in situ</i>	10380	---	---
Éster 2 <i>in situ</i>	11466	1,15	3,69

5.4.2.Linearidade

A linearidade foi determinada pela injeção de amostras, de cada um dos ésteres com concentrações desde o limite de detecção até 120% do limite de especificação (7,5ppm). Utilizaram-se seis concentrações, uniformemente distribuídas na gama de trabalho, e as amostras foram analisadas em triplicado. A linearidade do método foi avaliada estatisticamente de acordo com a norma ISO 8466-1 [22].

Com o sinal obtido para cada nível de concentração determinaram-se as rectas de calibração, segundo o método dos mínimos quadrados, para cada um dos ésteres (Figuras 5.17, 5.19 e 5.21). Os respectivos gráficos dos resíduos são apresentados nas Figuras de 5.18, 5.20 e 5.22. Na Tabela 5.7 encontram-se as incertezas associadas aos parâmetros da regressão, as tabelas de resultados completos encontram-se no Anexo VI.

O valor do coeficiente de correlação é superior a 0,999 para os três casos em estudo. Além disso verifica-se também que o desvio padrão relativo (RSD) é inferior a 10% para cada uma das concentrações analisadas, considerando-se assim que existe linearidade e a recta de calibração é uma boa representação do sinal em função da concentração. Nas figuras dos resíduos verifica-se que os pontos se distribuem de forma aleatória em torno de zero. Dessa forma espera-se que os erros sejam independentes, de média nula e de variância constante (homocedasticidade).

Tabela 5.7 Incertezas associadas aos parâmetros da regressão.

Éster	Erro padrão (Regressão)	Erro padrão (ordenada na origem)	Erro padrão (declive)
Éster 1 Padrão	0,104	0,070	405,9
Éster 1 <i>in situ</i>	0,067	0,045	299,8
Éster 2 <i>in situ</i>	0,031	0,021	109,9

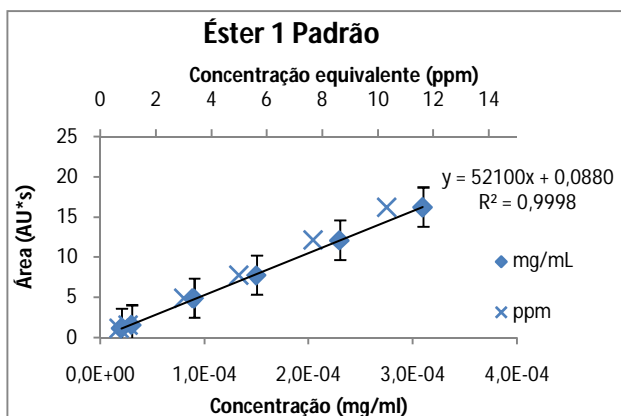


Figura 5.17 Resultados experimentais (área dos picos cromatográficos vs concentração) regressão linear para o éster 1 padrão.

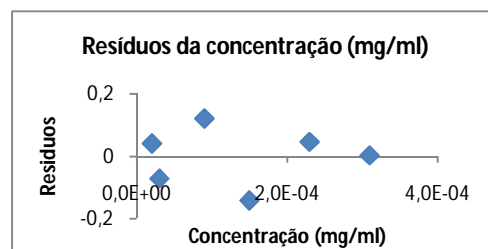


Figura 5.18 Gráfico dos resíduos da recta de calibração para o éster 1 padrão.

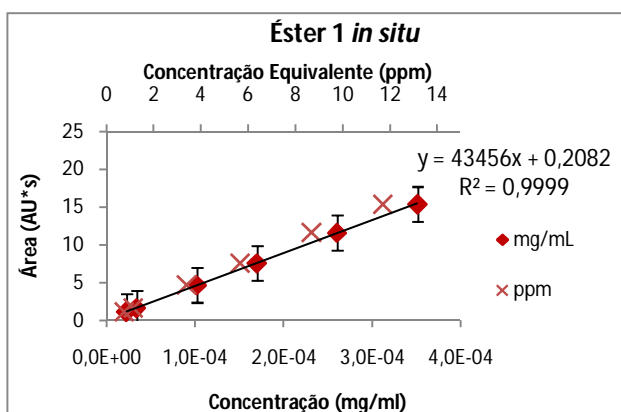


Figura 5.19 Resultados experimentais (área dos picos cromatográficos vs concentração) regressão linear para o éster 1 (*in situ*).

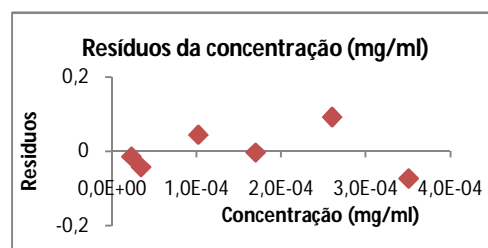


Figura 5.20 Gráfico dos resíduos da recta de calibração para o éster 1 (*in situ*).

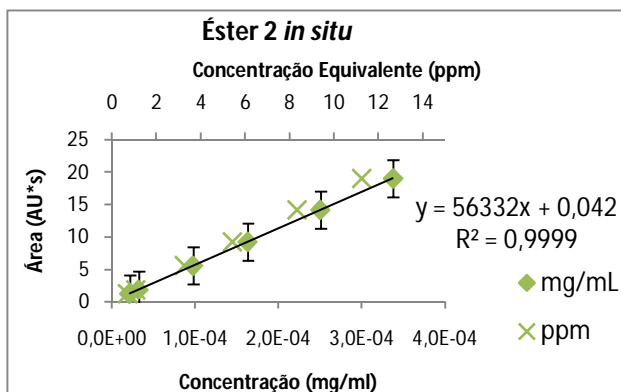


Figura 5.21 Resultados experimentais (área dos picos cromatográficos vs concentração) regressão linear para o éster 2 (*in situ*).

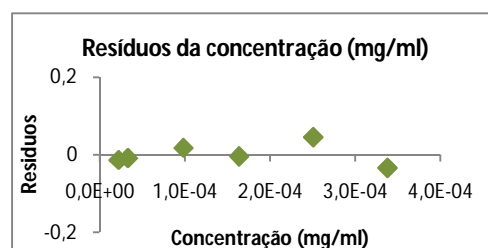


Figura 5.22 Gráfico dos resíduos da recta de calibração para o éster 2 (*in situ*).

Considerando o erro associado à ordenada na origem ($a \pm \Delta a$) e a equação na base do método analítico [Lambert-Beer], testou-se a hipótese da ordenada na origem ser nula. Efectuou-se o teste à regressão linear com base em ANOVA em que se testaram duas hipóteses

$$H_0: b=0 \text{ vs } H_1: b \neq 0$$

A hipótese nula é admitida que a variação de y não depende de x , portanto rejeitando H_0 admite-se que y é função de x , para isso comparam-se o valor da média do quadrado da regressão com a média do quadrado dos resíduos (Tabela 5.8). Como se pode verificar pela avaliação das médias dos quadrados, a MQ da regressão é significativamente maior que MQ dos resíduos, logo rejeita-se H_0 , y é função de x , a ordenada na origem não pode ser considerada nula, os resultados de ANOVA encontram-se no anexo VI.

Tabela 5.8 Resultados de ANOVA para a média do quadrado (MQ) da regressão e dos resíduos.

Éster	MQ regressão	MQ resíduos
Éster 1 Padrão	179,1	$1,087 \times 10^{-2}$
Éster 1 <i>in situ</i>	160,0	$4,474 \times 10^{-3}$
Éster 2 <i>in situ</i>	248,4	$9,462 \times 10^{-4}$

Para se testar a homogeneidade de variâncias fez-se o teste PG, ou seja comparam-se as variâncias associadas ao primeiro e ao último padrão, com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher. Verificou-se que as gamas de trabalho para cada um dos ésteres estão bem ajustadas dado que $PG \leq F$ tabelado (99%).

A linearidade é ainda avaliada estatisticamente comparando a função de calibração linear (ISO 8466-1) com uma função de calibração não linear (ISO 8466-2), equação de 2º grau, cálculo desenvolvido no Anexo VI. Com os resultados obtidos pode-se concluir que as funções de calibração dos ésteres em análise são lineares, uma vez que $F \leq F$ tabelado e ainda que a gama de trabalho está bem ajustada, $PG \leq F$. Os resultados para cada avaliação estão representados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Resumo dos resultados obtidos para a linearidade dos ésteres.

Éster	Recta de calibração			Homogeneidade de variâncias		Teste de F-Snedecor	
	Declive	Ordenada na origem	R ²	PG	F tabelado 99%	F	F tabelado 95%
Éster 1 Padrão	52100	0,088	0,9998	1,461	34,12	0,037	10,13
Éster 1 <i>in situ</i>	43456	0,208	0,9999	10,47	34,12	2,142	10,13
Éster 2 <i>in situ</i>	56333	0,041	0,9999	24,63	34,12	0,747	10,13

5.4.3. Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados pela relação sinal/ruído, (S/N). As soluções dos ésteres foram diluídas sucessivamente, de modo a que o sinal do éster tivesse uma determinada relação com o ruído do branco (metanol p.a.). Para o limite de quantificação a relação é 10:1 e para o limite de detecção é de 3:1.

As amostras de concentração correspondente aos limites LQ e LD foram injectadas 6 e 3 vezes respectivamente. O parâmetro S/N foi calculado como se descreve em 5.3 e como se apresenta detalhadamente no Anexo IV. Na Tabela 5.10 são apresentados os resultados para o LQ e LD.

Tabela 5.10 Tabela dos resultados para o LQ e LD.

Ésteres	Concentração (mg/ml)	S/N	Média da área (AU*s)	RSD (%)	Concentração equivalente na amostra (ppm)
Éster 1 Padrão	1,987x10 ⁻⁰⁵	18,45	0,989	6,356	0,662
Éster 1 (<i>in situ</i>)	2,188x10 ⁻⁰⁵	11,96	0,962	6,599	0,729
Éster 2 (<i>in situ</i>)	2,139x10 ⁻⁰⁵	16,63	0,967	5,602	0,713
Éster 1 Padrão	9,816x10 ⁻⁰⁶	10,38	0,573	7,570	0,327
Éster 1 (<i>in situ</i>)	1,094x10 ⁻⁰⁵	7,690	0,547	3,668	0,365
Éster 2 (<i>in situ</i>)	1,069x10 ⁻⁰⁵	9,000	0,537	4,124	0,356

A sensibilidade avalia a capacidade do método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. No caso da curva de calibração ser definida por um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e o valor é igual ao declive dessa recta. Na Tabela 5.11 apresentam-se os resultados da sensibilidade para cada éster em estudo.

Tabela 5.11 Resultados para a sensibilidade dos ésteres.

	Éster 1 Padrão	Éster 1 <i>in situ</i>	Éster 2 <i>in situ</i>
Sensibilidade (UA*s/(mg/mL))	52100	43456	56333

5.4.4.Exactidão

A exactidão foi avaliada pelo cálculo da recuperação do analito. Este método consiste na adição de quantidades conhecidas das impurezas à amostra, através da análise cromatográfica calcula-se a concentração que se detecta na amostra. Para este teste adicionaram-se à amostra de API (30mg/mL), concentrações conhecidas dos ésteres (padrão e *in situ*) e determinou-se a percentagem de recuperação, ver Tabela 5.12. As amostras foram analisadas em triplicado cobrindo quatro pontos no intervalo de trabalho. Para avaliação da exactidão os critérios utilizados foram o RSD $\leq 10\%$ e uma taxa de recuperação entre 90% e 110%.

Tabela 5.12 Análise da recuperação para cada éster.

Éster	Concentração adicionada (mg/mL)	Média área (AU*s)	RSD (%)	Concentração equivalente na amostra (ppm)	Concentração experimental (ppm)	Recuperação (%)
Éster 1 Padrão	2,347x10 ⁻⁰⁴	12,66	0,390	7,833	7,767	99,16
	1,531x10 ⁻⁰⁴	8,159	0,536	5,101	4,998	97,97
	9,184x10 ⁻⁰⁵	5,055	0,669	3,063	3,099	101,2
	2,041x10 ⁻⁰⁵	1,157	3,306	0,680	0,709	104,2
Éster 1 <i>in situ</i>	2,614x10 ⁻⁰⁴	12,38	0,472	8,735	8,618	98,66
	1,705x10 ⁻⁰⁴	7,841	0,901	5,695	5,456	95,80
	1,023x10 ⁻⁰⁴	4,755	1,255	3,410	3,302	96,82
	2,273x10 ⁻⁰⁵	1,043	2,743	0,759	0,726	95,55
Éster 2 <i>in situ</i>	2,513x10 ⁻⁰⁴	11,56	0,652	8,377	8,249	98,47
	1,639x10 ⁻⁰⁴	7,520	0,468	5,476	5,380	98,25
	9,835x10 ⁻⁰⁵	4,479	2,170	3,282	3,201	97,52
	2,185x10 ⁻⁰⁵	0,945	5,461	0,730	0,676	92,56

5.4.5.Precisão

A precisão é um termo geral que avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra em condições definidas e foi avaliado quanto à repetibilidade e precisão intermédia.

5.4.5.1. Repetibilidade e Precisão intermédia

A repetibilidade representa a concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo método (ISO 3534). Foram efectuadas $n \geq 6$ determinações por fortificação de amostras no limite de especificação sobre as mesmas condições de medição e analisadas através do desvio padrão relativo e da recuperação [20].

A precisão intermédia é reconhecida como sendo a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Avalia a variabilidade intermédia do método (ISO 5725-3).

Os resultados dos parâmetros para cada um dos ésteres estão representados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 Resultados para a análise da precisão para cada éster.

Éster	Data	Concentração (mg/ml)	Concentração equivalente na amostra (ppm)	Concentração experimental (ppm)	RSD (%)	Recuperação (%)
Éster 1 Padrão	19/04	$2,347 \times 10^{-4}$	7,826	7,713	0,6479	98,39
	21/04	$2,356 \times 10^{-4}$	7,856	7,708	0,7236	97,99
Éster 1 in situ	07/04	$2,614 \times 10^{-4}$	8,731	8,477	1,289	97,20
	28/04	$2,634 \times 10^{-4}$	8,787	8,634	0,6377	98,27
Éster 2 in situ	20/04	$2,513 \times 10^{-4}$	8,381	8,132	1,106	97,15
	02/05	$2,508 \times 10^{-4}$	8,366	8,089	0,6140	96,66

Como se pode verificar os testes efectuados para a repetibilidade respeitam os critérios de RSD inferior a 10% e taxa a recuperação encontra-se entre 90% e 110%. A precisão intermédia foi avaliada por dois analistas em dois dias diferentes a partir do teste de ANOVA, Tabela 5.14. Resultados obtidos para ANOVA encontram-se no Anexo VII.

Tabela 5.14 Resultados do teste de ANOVA.

	Éster 1 Padrão	Éster 1 in situ	Éster 2 in situ
F_0	0,102	3,824	2,489
F crítico	4,965	4,965	4,965
Valor de P	0,756	0,079	0,146

Pelo resultado do teste de ANOVA verifica-se que $F_0 < F$ crítico e por esse motivo H_0 não é rejeitado, logo pode-se considerar-se que as médias entre os grupos são iguais.

5.4.6. Intervalo de Linearidade

O intervalo de linearidade é o intervalo em que o método analítico demonstra ser preciso, exacto e linear. O intervalo do método vai desde o LQ, $2,0 \times 10^{-5} \text{mg/mL}$ até 120% do limite de especificação, $3,0 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$. A concentração equivalente ao LQ é $2,0 \times 10^{-5} \text{mg/mL}$ e LD $1,0 \times 10^{-5} \text{mg/mL}$.

5.4.7. Factor de resposta relativo

O factor de resposta relativo (RRF) pode ser utilizado para corrigir as diferenças na resposta relativa entre substâncias numa amostra de fármaco. Para este trabalho corrigiu-se a resposta do éster 2 *in situ* em função da resposta do éster 1 padrão. Este método permitirá eliminar os procedimentos de esterificação *in situ* dos ésteres e consequentemente a síntese de diazometano. Os resultados obtidos para a determinação do factor de correcção para o éster 2 *in situ* está representado na Tabela 5.15. Concluindo-se ser-se possível, numa amostra de API, determinar-se a concentração do éster 2 a partir da concentração do éster 1 padrão.

Tabela 5.15 Resumo dos factores de correcção.

Impureza	Factor de resposta (declive das rectas)		
	Declive	RRF	Factor de correcção
Éster 1 Padrão	52100	1,081	0,925
Éster 2 <i>in situ</i>	56333		

6. Conclusões e considerações finais

Neste trabalho optimizou-se e validou-se um método cromatográfico em HPLC-UV para determinação de impurezas genotóxicas num API. Este trabalho é de extrema importância por se quantificar ésteres preparados *in situ* e ainda tratar-se de um método em HPLC-UV nunca antes descrito com a finalidade de quantificar estes ésteres em concentrações tão baixas, ordem dos ppm. Podendo-se concluir que a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) pode ser utilizada para quantificar ésteres em fármacos.

Para a realização deste trabalho foram tidos em conta documentos normativos específicos para validação de impurezas em HPLC-UV com limite de TTC (1.0-1.5µg/dia) e critérios de aceitabilidade definidos por entidades reguladoras, nomeadamente ICH, EMA e RELACRE.

As condições óptimas para a determinação dos ésteres para este método utiliza modo isocrático, com um fluxo de 1,5 mL/min, a temperatura da coluna é 45°C e as amostras estão a 5°C, cada corrida dura 20 min.

A filtração das amostras como medida preventiva para o HPLC e para a coluna cromatográfica revelou-se problemática, após análise das amostras no método desenvolvido. A contaminação das amostras por resíduos alterou significativamente os resultados obtidos e pôs em causa entre outros o método desenvolvido. Após análise crítica concluiu-se que a contaminação das amostras provinha dos filtros e optou-se por não se filtrar as amostras, adoptando-se como medida de precaução a lavagem frequente do aparelho e da coluna cromatográfica.

Os ésteres foram preparados *in situ* por metilação dos respectivos ácidos com solução etérea de diazometano, utilizando-se um éster padrão fundamental para comparação dos resultados obtidos.

Este trabalho permitiu analisar o mesmo éster sulfónico, comprado e preparado *in situ*. Este procedimento teve como objectivo comprovar que o procedimento de esterificação do ácido 1 com excesso de diazometano é indicado para obtenção do respectivo éster sulfónico. Analisando-se em HPLC-UV o éster 1 (padrão e *in situ*) observou-se que na solução que resultou da reacção de esterificação existia um pico com o mesmo tempo de retenção do éster 1. Este resultado foi observado a concentrações e dias diferentes e fazendo-se variar o caudal do método para se comprovar que não existam impurezas a co-

existir com o éster 1. Para a mesma concentração obteve-se aproximadamente a mesma área de resposta, concluindo-se que o pico observado era efectivamente do éster 1 preparado *in situ*. Este resultado comprova ser-se possível analisar pelo método desenvolvido ésteres preparados *in situ*.

Após obter bons resultados para o éster 1 preparado *in situ* o mesmo procedimento de esterificação foi aplicado ao ácido 1 obtendo-se um pico no cromatograma correspondente que não interferia com o tempo de retenção do éster 1. O éster 2, que não está disponível para compra, neste trabalho tem um papel fundamental por se tratar de um dos ésteres em estudo. Por esse motivo a necessidade de validar não só o éster 1 padrão mas também o éster 1 *in situ*, pois validando-se o método para o este 1 *in situ* conseguiu-se uma boa relação para os resultados obtidos para o éster 2 *in situ* e validar-se o método também para este éster, evidenciando-se que conseguiu-se atingir o objectivo.

O método desenvolvido atende aos limites pré-estabelecidos para os parâmetros de validação e um método analítico em HPLC, apresentando boa especificidade, linearidade para os ésteres padrão e *in situ* com $R^2 > 0,995$, exactidão com recuperação entre 80% e 110% e precisão com desvio padrão residual $< 10\%$ e percentagens de recuperação próximas de 100%.

O método foi validado para um intervalo de concentração dos ésteres de $3,1 \times 10^{-4}$ mg/mL a $2,0 \times 10^{-5}$ mg/mL que equivale na amostra de API (30mg/mL) de 10ppm e a 0,67pmm, respectivamente. Foram ainda determinados o LQ $1,0 \times 10^{-5}$ mg/mL e o LD $2,0 \times 10^{-5}$ mg/mL, concentrações equivalentes ao S/N superior a 10 para o LQ e superior a 3 para o LD.

Calculou-se o factor de resposta relativa (RRF) de 1,0812, que relaciona o éster 2 preparado *in situ* com o éster 1 padrão, e ainda o factor de correcção (FC) de 0,925 que dispensa todo o processo de preparação do éster 2 *in situ*

Durante a pesquisa para o desenvolvimento deste documento poucos foram os trabalhos encontrados em que se analisa por HPLC-UV ésteres em APIs. A grande maioria dos trabalhos encontrados indicava que o método mais utilizado e aconselhável para a análise destes compostos seria a cromatografia gasosa (GC). Após este estudo verificamos ser possível analisar ésteres por HPLC-UV em quantidades vestigiais no fármaco como também preparar os mesmos *in situ* e analisa-los tendo resultados muito próximos dos resultados obtidos para padrões de compra, ultrapassando um problema de falta de padrão no mercado comercial. Este método pode ainda ser aplicado a outros APIs para análise destes compostos.

No futuro devem-se efectuar análises mais detalhadas à robustez do método, pois de todos os parâmetros foi aquele menos estudado devido à limitação de tempo. Sendo um método analítico que pelas suas características não está descrito este parâmetro é de extrema importância como medida de maior confiança relativamente à precisão do método. Este parâmetro pode e deve ser avaliado pela proposta feita neste trabalho no anexo VIII, teste de Youden.

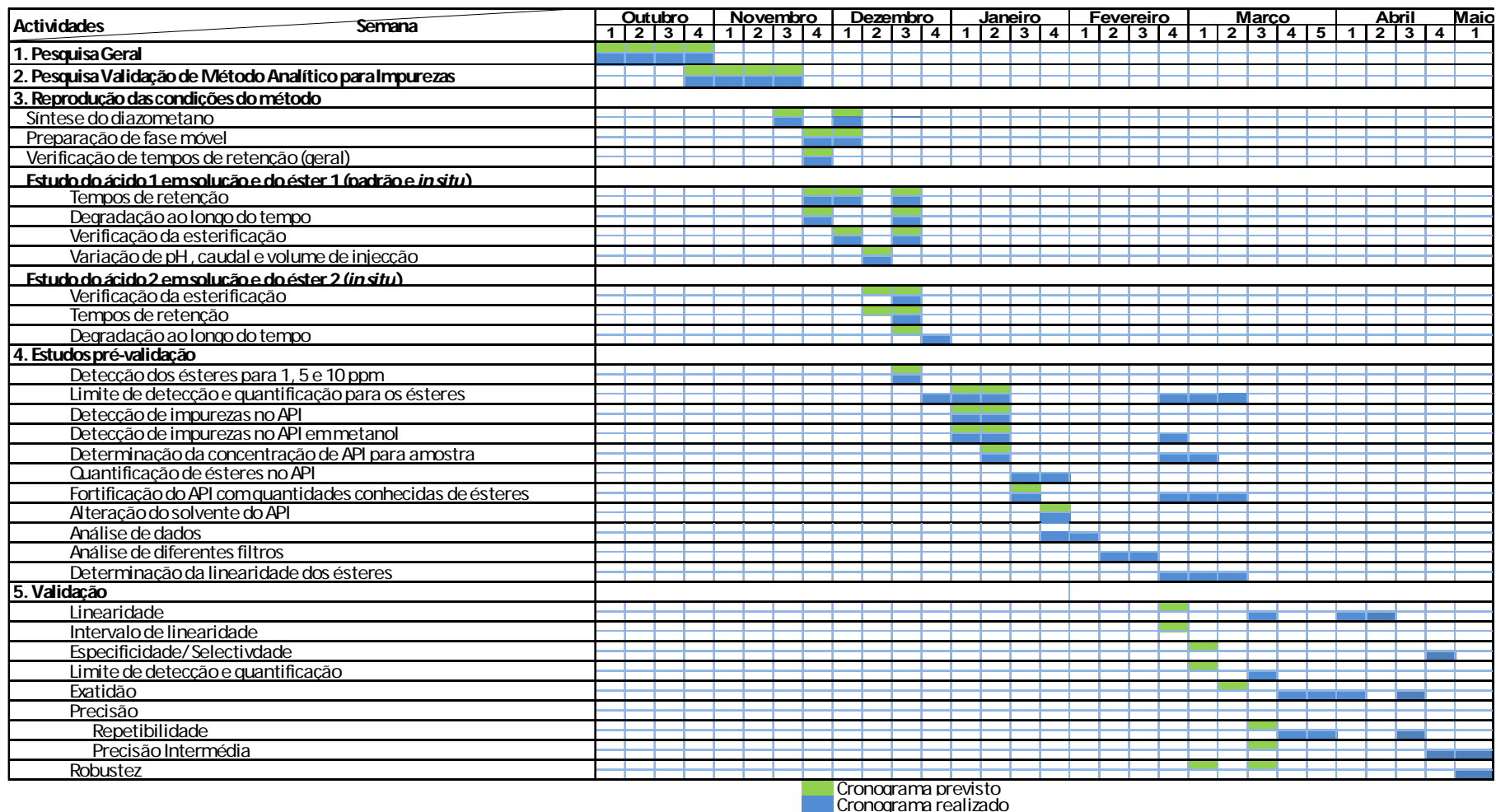
7. Bibliografia

1. Cipan. *Atral Cipan*. [cited 2010 20 Novembro 16:35]; Available from: www.atralcipan.pt.
2. Mitscher, L.A., *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics (Medicinal Research Series)*. Marcel Dekker, INC ed. Vol. 9. 1978, New York.
3. Pereira-Maia, E.C., P. Silva, W. Batista de Almeida, H. Santos, B. Marcial, R. Ruggiero, and W. Guerra, *Tetraciclínas e glicilciclínas: uma visão geral*. Química Nova [online], 2010. 33(3): p. 700 - 706.
4. Robinson, D.I., *Control of Genotoxic Impurities in Active Pharmaceutical Ingredients: A Review and Perspective*. Organic Process Research & Development, 2010. 14(4): p. 946-959.
5. Ann M. Thayer, C.H., *Genotoxic Impurities*. Chemical & Engineering News, 2010. 88: p. 16-26.
6. Pierson, D.A., B.A. Olsen, A.K. Robbins, K.M. DeVries, and D.L. Varie, *Approaches to Assessment, Testing Decisions, and Analytical Determination of Genotoxic Impurities in Drug Substances*. Organic Process Research & Development, 2009. 13(2): p. 285-291.
7. Snodin, D.J., *Genotoxic Impurities: From Structural Alerts to Qualification*. Organic Process Research & Development, 2010. 14(4): p. 960-976.
8. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, I., *Final Concept Paper M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk dated 27 November 2009*. 2010.
9. Kushwaha, P., *The organic impurities in pharmaceuticals*. Pharma info., 2008. 6(4).
10. ICH. *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. in CPMP/ICH/381/95. 1995.
11. Sun, M.J., D.Q. Liu, and A.S. Kord, *A Systematic Method Development Strategy for Determination of Pharmaceutical Genotoxic Impurities*. Organic Process Research & Development, 2010. 14(4): p. 977-985.
12. Muller, L., R.J. Mauthe, C.M. Riley, M.M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. DeGeorge, A.G.M. De Knaep, D. Ellison, J.A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C.D.N. Humfrey, A.S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D.K. Ness, M.R. O'Donovan, M.D. Smith, G. Vudathala, and L. Yotti, *A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006. 44(3): p. 198-211.
13. Dobo, K.L., M.O. Kenyon, J.R. Cheung, and W.W. Ku, *An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2007. 48(1): p. 75-86.
14. ICH, *Guidance for Industry, Impurities in New Drug Substance Q3A(R2)*. 2006.
15. Liu, D.Q., M. Sun, and A.S. Kord, *Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. 51(5): p. 999-1014.
16. Scott, R.P.W., *An Introduction to Chromatography*, in *Liquid Chromatography for the Analyst*, J. Cazes, Editor. 1994, Taylor & Francis, Inc.: Mount Laurel, New Jersey. p. 1-13.
17. *Portal laboratórios virtuais de processos químicos*. [cited 2011 19 de Fevereiro 19:06]; Available from: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=451.

18. Scott, R.P.W., *The Liquid Chromatography Detectors*, in *Liquid Chromatography for the Analyst*, J. Cazes, Editor. 1994, Taylor & Francis, Inc.: Mount Laurel, New Jersey. p. 157-193.
19. Falon, A., R.F.G. Booth, and L.D. Bell, *Applications of Hplc in Biochemistry (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)*. Vol. 17. 1994, Amsterdam: ELSEVIER.
20. Chung Chow Chan, P.D., *Potency Method Validation*, in *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Y.C.L. Chung Chow Chan, Herman Lam, Xue-Ming Zhang, Editor. 2004, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey. p. 11-26.
21. Ermer, J., *Analytical Validation within the Pharmaceutical Environment*, in *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, J.E.a.J.H.M. Miller, Editor. 2005, WILEY-VCH p. 3-14.
22. CTR03, *Guia RELCRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. 2000, Lisboa.
23. Lee, Y.C., *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, in *Method validation for HPLC analysis of related substances in pharmaceutical drug products*, I. John Wiley & Sons, Editor. 2004. p. 27-49.
24. Reed, J.A.M.D.E., *Diazomethane*. Organic Syntheses, 1973. Vol. 5: p. 351.

Anexos

I. Cronograma de Estágio



II. Desenvolvimento do método

Para análise dos ésteres, impurezas genotóxicas, eventualmente presentes no API foi desenvolvido no laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN, pela Doutora Dália Barbosa e pela Catarina Alves durante o seu estágio, um método baseado em HPLC-UV.

Os ésteres em estudo neste método, ésteres 1 e 2, são considerados potenciais impurezas genotóxicas que poderiam estar presentes no API e por essa razão estão sob controlo das entidades reguladoras.

O éster 1 existe em padrão de compra, ao contrário do éster 2 que não existe. Por esta razão optou-se pela sua preparação *in situ*, a partir dos respectivos ácidos.

O trabalho da Catarina Alves incluiu a pesquisa e desenvolvimento de uma técnica para produção das impurezas, no laboratório, criando soluções padrão das mesmas e ainda a preparação da solução de diazometano.

O trabalho de desenvolvimento do método abrangeu os seguintes pontos:

- Teste do desempenho de diferentes colunas;
- Teste à fase móvel em modos diferentes;
- Teste a vários brancos e solventes

Os parâmetros testados para o desenvolvimento do método, são apresentados na tabela I.1. Do trabalho desenvolvido, verificou-se que o comprimento de onda que permitiu obter melhores resultados foi a 226 nm, o solvente em que se obteve melhores resultados foi o metanol, o método obteve melhores resultados para modo isocrático 50% eluente A e 50% eluente B.

Tabela II.1 Condições testadas para desenvolvimento do método analítico.

Parâmetros do Método	Descrição
Técnica	Cromatografia Líquida (HPLC-UV)
Equipamento	Waters 2695, detector fotodíodo 2996
Coluna	C8 250mm x 4,6mm (5µm), C8 250mm x 4,6mm (5µm), C18 250mm x 4,6mm (5µm), C8 250mm x 4,6mm (5µm)
Modo	Gradiente; Isocrático
Fluxo	1.5 mL/min
Detector UV (λ)	Varrimento de 210 a 600nm
Solvente para dissolução de amostras	Metanol
Fase móvel	50% da solução A e 50% da solução B
Eluente A	0,1% (v/v) de ácido ortofosfórico em água
Eluente B	0,1%(v/v) de ácido ortofosfórico em solução 80% acetonitrilo em água
Gradiente	10 min 23% a 100% solução B 5 min 100% eluente B 10 min 100% a 23% do eluente B
Isocrático	50% eluente A e 50% eluente B 15% eluente A e 85% eluente B
Volume de injeção	20 µl
Temperatura da coluna	45°C
Tempo de corrida	20 min
Solvente para dissolução das amostras	Água; Metanol

III. Determinação da pureza dos ácidos e do comprimento de onda máximo

Neste anexo está descrito todo o procedimento para determinação da pureza dos ácidos e do melhor comprimento de onda para detecção dos ésteres.

- Determinação da pureza dos ácidos

A determinação da pureza dos ácidos, mais conhecida como actividade na indústria farmacêutica por se tratar da fracção activa do composto, é um parâmetro necessário para se calcular a concentração dos ácidos e respectivos ésteres *in situ*, para este cálculo considerou-se o critério definido pela FDA e seguido pela CIPAN.

$$\text{Actividade} = 100 - \% \text{cromatográfica} - \text{humidade} - \text{solventes}$$

Para os ácidos apenas vamos considerar a humidade uma vez que foram efectuadas as análises de rotina e emitidos os devidos certificados de controlo de qualidade na recepção das matérias-primas. A pureza é calculada pela equação III.1:

$$\text{Pureza anidra (\%)} = \frac{\text{Doseamento Volumétrico (\%)}}{100\% - \text{humidade (\%)}} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

A concentração dos ácidos foi calculada de acordo com a equação III.3. A reacção de esterificação com diazometano foi considerada completa, 1mol de ácido reage formando uma mol do respectivo éster. Para se calcular a concentração dos ésteres considerou-se a concentração(mg/mL) e massa molecular dos respectivos ácidos calculando-se a concentração (mol/mL) esta concentração foi considerada a mesma para os ésteres.

$$\text{concentração ácido} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \text{concentração} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{pureza (\%)} \quad (\text{III.2})$$

- Determinação do comprimento de onda do método

O comprimento de onda foi determinado no espectrofotómetro UNICAM UV/Vis UV3 com células de quartzo, onde se variou o comprimento de onda de 190 nm a 860 nm, para os ácidos e ésteres na mesma concentração molar, metanol e solução de metanol + diazometano. Definiu-se que a massa de ácido 1 seria 10 mg e o éster 1 *in situ* seria preparado a partir da solução do ácido 1, o ácido 2 e éster 1 padrão de compra teriam a massa equivalente ao número de moles do ácido 1, e de acordo com as respectivas purezas.

As soluções para análise foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento:

1. Solução *stock* concentrada do ácido 0,5mg/mL em metanol p.a.
-Para o ácido 1 pesaram-se cerca 10,0mg para um balão aferido de 20mL e fez-se o volume com metanol p.a.
2. Preparação da solução *stock* A, $9,85 \times 10^{-2}$ mg/mL por transferência com uma pipeta volumétrica de 4,0mL da solução *stock* 0,5 mg/mL para um balão aferido de 20mL, adicionando-se metanol p.a. para perfazer o volume.
3. Preparação da solução *stock* B, $3,94 \times 10^{-3}$ mg/mL, por transferência com uma pipeta volumétrica de 1,0mL da solução *stock* A para um balão aferido de 25mL, (este procedimento foi preparado em duplicado para os ácidos).

Os ácidos e ésteres *in situ* foram preparados com base na solução *stock* B onde num balão fez-se com metanol p.a. e noutro adicionando-se solução etérea de diazometano em excesso à solução e fez-se com metanol p.a. As concentrações e massas dos ácidos e do éster 1 padrão estão apresentados na tabela III.1. Os cromatogramas e espectros de cada ácido e éster estão apresentados nas Figuras III.1 e III.5. Foram ainda analisados no espectrofotómetro uma amostra de metanol p.a. e uma amostra de diazometano + metanol (4:10), os cromatogramas e espectros estão apresentados nas Figuras III.6 e III.7 respectivamente.

Tabela III.1 Dados para os ácidos e ésteres.

Impureza	Concentração molar (mol/mL)	Concentração mássiva (mg/mL)	Massa (mg)
Ácido 1		$3,94 \times 10^{-3}$	10,00
Éster 1 Padrão	$2,07 \times 10^{-8}$	$3,85 \times 10^{-3}$	9,936
Ácido 2		$3,98 \times 10^{-3}$	10,18

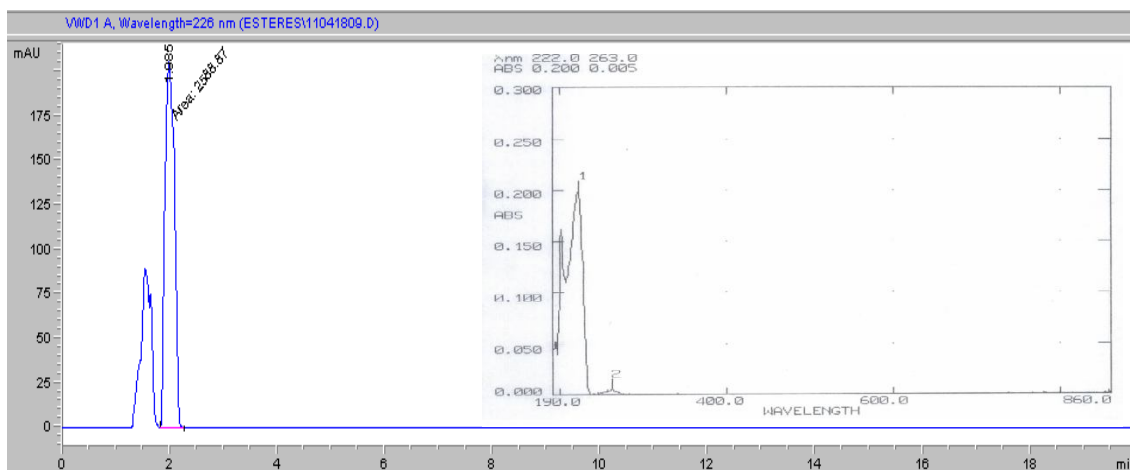


Figura III.1 Cromatograma e espectro do ácido 1.

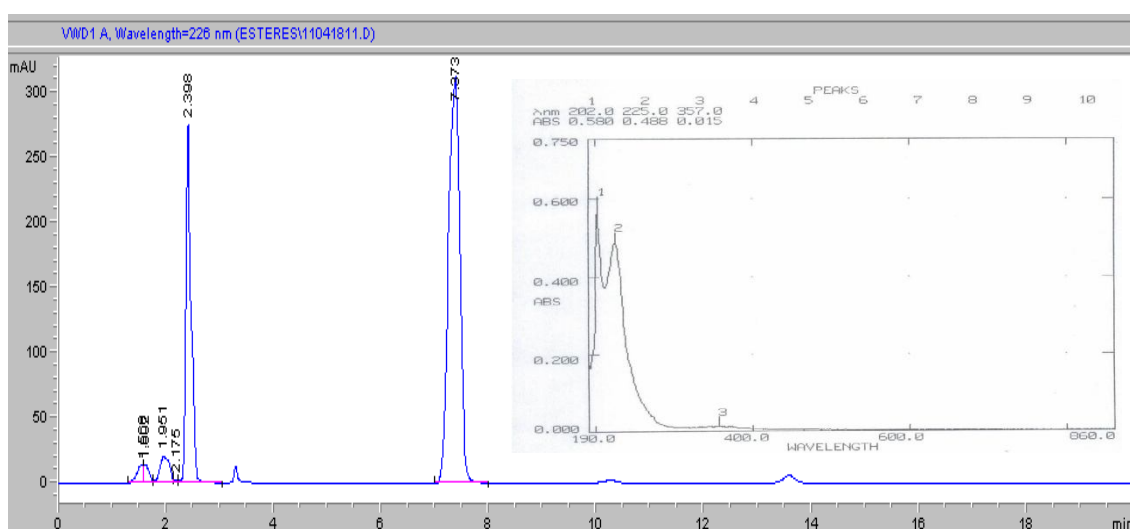


Figura III.2 Cromatograma e espectro do éster 1 *in situ*.

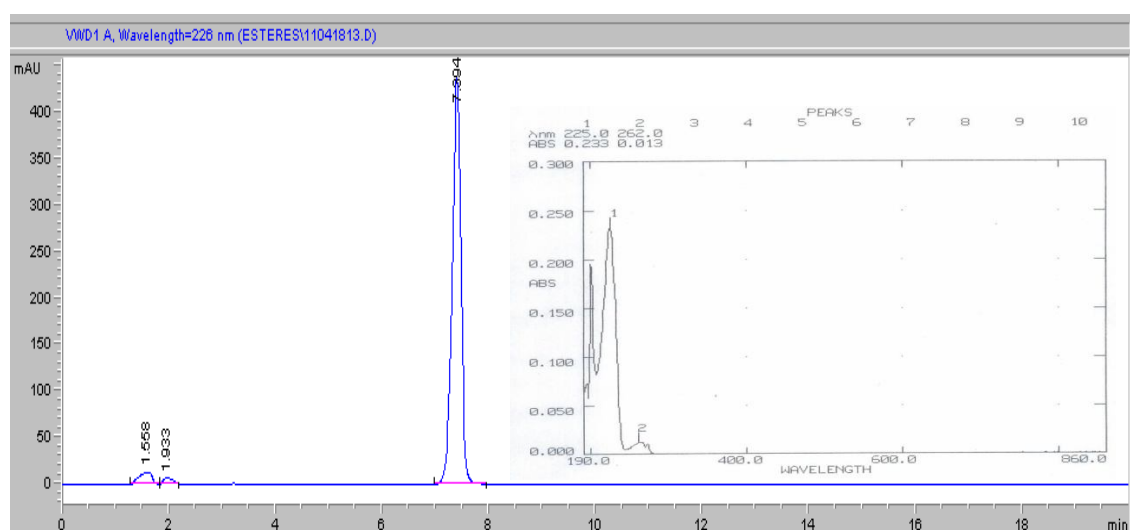


Figura III.3 Cromatograma e espectro do éster 1 padrão.

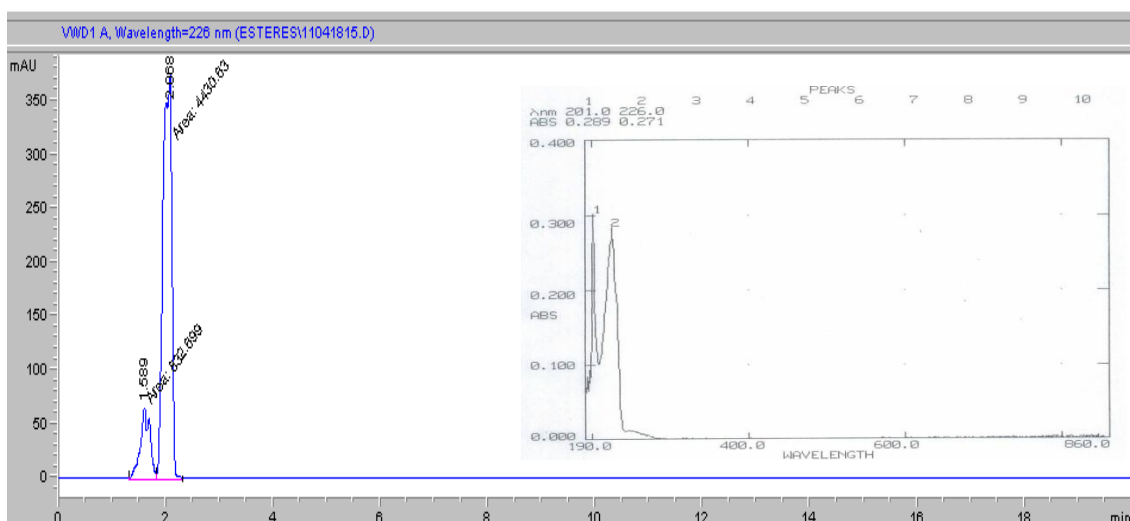


Figura III.4 Cromatograma e espectro do ácido 2.

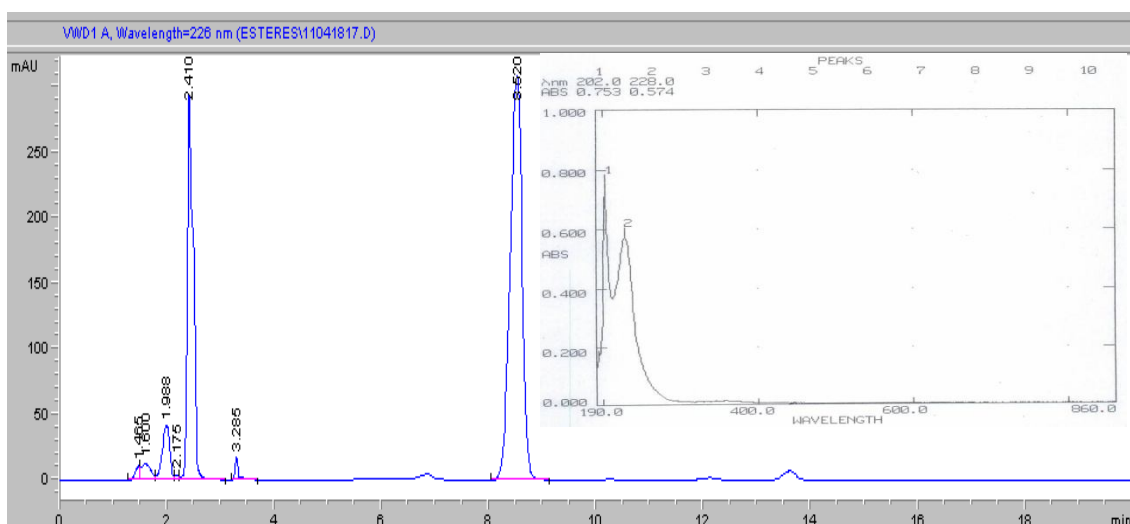


Figura III.5 Cromatograma e espectro do éster 2 *in situ*.

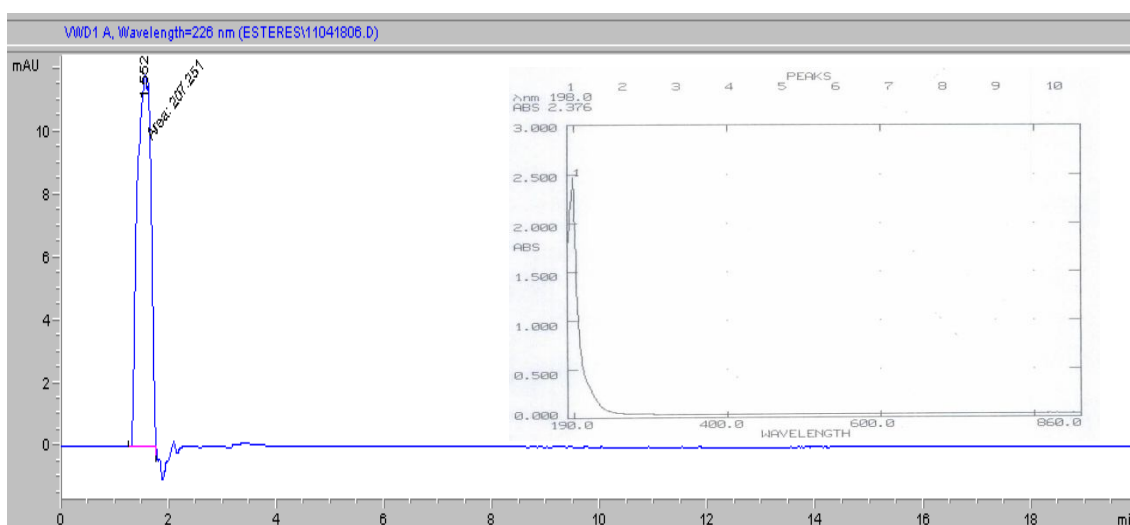


Figura III.6 Cromatograma e espectro do metanol p.a.

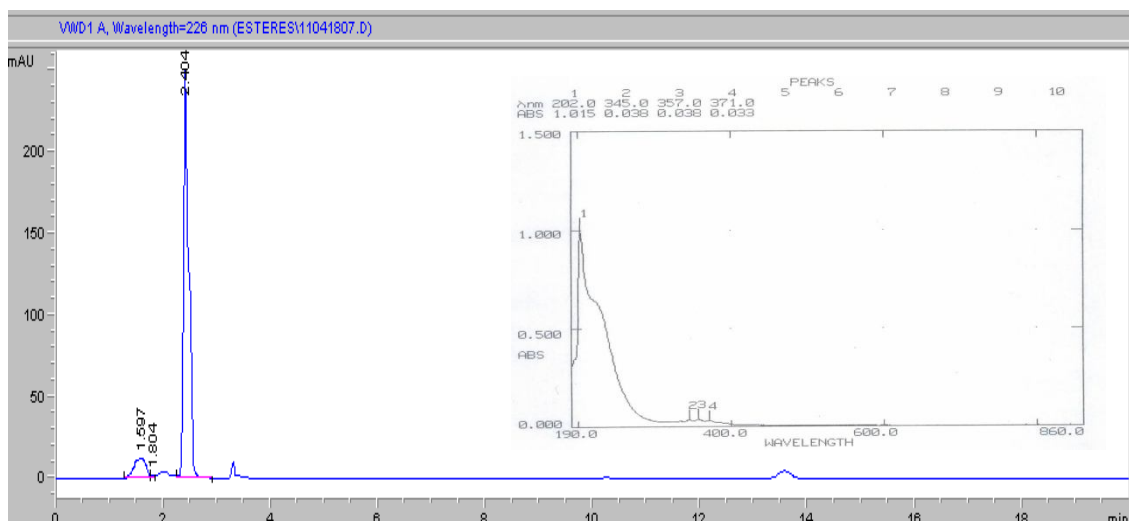


Figura III.7 Cromatograma e espectro da solução etérea de diazometano em metanol p.a.

De acordo com este teste definiu-se que o comprimento de onda adequado ao método seria 226 nm, dado que neste comprimento de onda todas as amostras têm maior absorbância. Inicialmente pensou-se calcular um factor correctivo para pureza a partir do coeficiente de absorvidade molar, mas tal não foi possível por todas as amostras terem maior absorbância no mesmo comprimento de onda.

IV. Cálculo do Limite de quantificação e de detecção

Neste anexo será descrito o cálculo do sinal/ruído (S/N) para determinação do limite de quantificação e detecção dos ésteres.

O S/N foi determinado analisando-se em HPLC concentrações dos ésteres sucessivamente diluídas e calculando com base na comparação dos sinais obtidos para a amostra de cada um dos ésteres e o sinal e da amostra de um branco no mesmo tempo de retenção, pelas seguintes equações IV.1 e IV.2.

$$S/N = \frac{2 \times H}{h} \quad (IV.1)$$

sendo:

H- altura do pico do éster (cm);

h- altura do sinal de base do branco(cm).

em que h é determinado a partir do máximo e do mínimo do sinal observado para o branco a uma distância igual a 5 vezes a largura a meia altura (Equação IV.2) em que o ponto intermédio é o tempo de retenção do éster.

$$l = 5 \times y \quad (IV.2)$$

sendo:

l- largura medida para o ruído do branco no mesmo t_r (cm);

y- largura do pico à meia altura (cm).

A razão S/N para limite de quantificação deve ser superior a 10 e para o limite de quantificação superior a 3.

Na figura IV.1 e IV.2 apresenta-se um exemplo para o cálculo do limite de quantificação e limite de detecção, respectivamente.

V. Cálculo da recuperação e doseamento dos ésteres no API

Este anexo tem como objectivo demonstrar a forma como foram calculados a recuperação e o doseamento dos ésteres na amostra de fármaco.

A recuperação é um parâmetro de avaliação da exactidão do método analítico que foi determinado a partir da concentração equivalente (ppm) injectada e doseada na amostra de API, equação V.1.

O doseamento é muito utilizado na indústria farmacêutica e pretende quantificar na amostra de API (30mg) os ésteres. As soluções dos ésteres são preparadas e têm concentração conhecida que não corresponde à concentração desse mesmo éster no API (pó). O TTC define a quantidade máxima permitida para os ésteres no API (7,5ppm), preparar soluções com esta concentração e fortificar a amostra não corresponde a ter concentrações permitidas pelo limite de TTC, o doseamento é calculado pela Equação V.3.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Doseamento na amostra (ppm)}}{\text{Concentração equivalente (ppm)}} \times 100 \quad \text{V.1}$$

onde:

$$\text{Concentração equivalente (ppm)} = \frac{\zeta \text{ do } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times 100}{\text{Concentração da amostra } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \times 10000 \quad \text{V.2}$$

$$\text{Doseamento éster } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \frac{\zeta \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\frac{\text{Volume da amostra (mL)}}{\text{massa da amostra (mg)}}} \quad \text{V.3}$$

onde,

a concentração teórica é determinada pela equação da recta que passa no ponto (0,0) e no ponto teórico corresponde à concentração no limite de especificação (7,5ppm) determinada no dia do ensaio da exactidão. Este ponto teórico é determinado pela injeção 6 vezes de uma amostra com concentração no limite de especificação. A média da área dos seis pontos e o declive da recta dão a concentração teórica do éster. A concentração obtida para o doseamento do éster é convertida em ppm e este valor é utilizado para calcular a recuperação os resultados mais detalhados deste parâmetro estão apresentados na Tabela V.1.

Tabela V.1 Resultados mais detalhados para o parâmetro da exactidão.

Éster	Massa da amostra (mg)	Média do Sinal (AU*s)	RSD(%)	Concentração (mg/mL)	Concentração experimental (ppm)	declive	Concentração equivalente (mg/mL)	Concentração equivalente (ppm)	Recuperação (%)
Éster 1 Padrão	299,6	12,66	0,390	2,347x10 ⁻⁴	7,833	5,441x10 ⁴	7,767x10 ⁻⁶	7,767	99,16
	300,1	8,159	0,536	1,531x10 ⁻⁴	5,101		4,998x10 ⁻⁶	4,998	97,97
	299,8	5,055	0,669	9,184x10 ⁻⁵	3,063		3,099x10 ⁻⁶	3,099	101,2
	300,0	1,157	3,306	2,041x10 ⁻⁵	0,680		7,087x10 ⁻⁷	0,709	104,2
Éster 1 in situ	299,3	12,38	0,472	2,614x10 ⁻⁴	8,735	4,800x10 ⁴	8,618x10 ⁻⁶	8,618	98,67
	299,4	7,841	0,901	1,705x10 ⁻⁴	5,695		5,456x10 ⁻⁶	5,456	95,80
	300,0	4,755	1,255	1,023x10 ⁻⁴	3,410		3,302x10 ⁻⁶	3,302	96,82
	299,4	1,043	2,743	2,273x10 ⁻⁵	0,759		7,256x10 ⁻⁷	0,726	95,55
Éster 2 in situ	300,0	11,56	0,652	2,513x10 ⁻⁴	8,377	4,670x10 ⁴	8,249x10 ⁻⁶	8,249	98,47
	299,3	7,520	0,468	1,639x10 ⁻⁴	5,476		5,380x10 ⁻⁶	5,380	98,25
	299,6	4,479	2,170	9,835x10 ⁻⁵	3,282		3,201x10 ⁻⁶	3,201	97,52
	299,2	0,945	5,461	2,185x10 ⁻⁵	0,730		6,760x10 ⁻⁷	0,676	92,56

VI. Linearidade do método analítico

Nas tabelas de VI.1 a VI.3 estão apresentados os dados mais relevantes obtidos para a linearidade. Nas tabelas VI.4 a VI.6 estão apresentados os resultados obtidos para a regressão, ANOVA.

Tabela VI.1 Parâmetros de linearidade para o éster 1 padrão.

Concentração (mg/mL)	Média do sinal (AU*s)	RSD (%)	Concentração equivalente na amostra (ppm)	Critério
3,097x10 ⁻⁴	16,23	0,115	10,32	RSD ≤10%
2,298x10 ⁻⁴	12,10	0,476	7,660	
1,499x10 ⁻⁴	7,755	0,463	4,996	
8,992x10 ⁻⁵	4,894	0,664	2,997	
2,997x10 ⁻⁵	1,579	1,058	0,999	
1,998x10 ⁻⁵	1,171	1,746	0,666	

Tabela VI.2 Parâmetros de linearidade para o éster 1 *in situ*.

Concentração (mg/mL)	Média do sinal (AU*s)	RSD (%)	Concentração equivalente na amostra (ppm)	Critério
3,510x10 ⁻⁴	15,39	0,769	11,70	RSD ≤10%
2,604x10 ⁻⁴	11,62	0,678	8,682	
1,699x10 ⁻⁴	7,586	0,876	5,662	
1,019x10 ⁻⁴	4,681	0,516	3,397	
3,397x10 ⁻⁵	1,641	2,282	1,132	
2,265x10 ⁻⁵	1,177	5,589	0,755	

Tabela VI.3 Parâmetros de linearidade para o éster 2 *in situ*.

Concentração (mg/mL)	Média do sinal (AU*s)	RSD (%)	Concentração equivalente na amostra (ppm)	Critério
3,374x10 ⁻⁴	19,01	0,268	11,25	RSD ≤10%
2,503x10 ⁻⁴	14,19	0,576	8,345	
1,633x10 ⁻⁴	9,234	0,515	5,442	
9,796x10 ⁻⁵	5,577	1,359	3,265	
3,265x10 ⁻⁵	1,872	2,148	1,088	
2,177x10 ⁻⁵	1,254	1,825	0,726	

Tabela VI.4 Dados de ANOVA da regressão linear para o éster 1 padrão.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999879
Quadrado de R	0,999757
Quadrado de R ajustado	0,999696
Erro-padrão	0,104274
Observações	6

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	179,0554184	179,05542	1,647E+04	2,21163E-08
Residual	4	0,043492675	0,0108732		
Total	5	179,0989111			

	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,088005	0,070432929	1,2494899	0,2796074	-0,107547927	0,283558397
Concentração (mg/ml)	52100,13	405,9972901	128,3263	2,212E-08	50972,90049	53227,35887

Tabela VI.5 Dados de ANOVA da regressão linear para o éster 1 *in situ*.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999944
Quadrado de R	0,999888
Quadrado de R ajustado	0,99986
Erro-padrão	0,066885
Observações	6

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	160,0220397	160,02204	3,577E+04	4,6884E-09
Residual	4	0,017894384	0,0044736		
Total	5	160,0399341			

	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,208181	0,045177903	4,6080226	0,0099705	0,082746832	0,333614769
Concentração (mg/ml)	43455,79	229,7661816	189,13048	4,688E-09	42817,85424	44093,72062

Tabela VI.6 Dados de ANOVA da regressão linear para o éster 2 *in situ*.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999992
Quadrado de R	0,999985
Quadrado de R ajustado	0,999981
Erro-padrão	0,030761
Observações	6

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	248,4242682	248,42427	262544,82	8,70429E-11
Residual	4	0,003784866	9,462E-04		
Total	5	248,4280531			

	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,041777	0,020777485	2,010702	0,1147071	-0,015910216	0,099464876
Concentração (mg/ml)	56332,57	109,9405431	512,39127	8,704E-11	56027,33099	56637,81875

- Cálculos para determinação da linearidade do método

A linearidade foi determinada através de um modelo estatístico de acordo com a norma (ISO 8466-1), aplicado a um conjunto de pares ordenados. De acordo com esta norma traçou-se a linha de regressão, determinou-se expressão analítica utilizando o método dos mínimos quadrados e o desvio padrão residual da recta de regressão ($S_{y/x}$).

Obteve-se a recta $y=mx+b$ onde, y é a resposta instrumental do equipamento, x representa as concentrações dos padrões, m é o declive da recta calculado pela equação VII.1, b é a ordenada na origem calculada pela equação VII.2 e r o coeficiente de correlação calculado pela equação VII.3 o desvio padrão é calculado pela equação VII.4.

$$m = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{VI.1})$$

$$b = \bar{y} - b \times \bar{x} \quad (\text{VI.2})$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (\text{VI.3})$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N-2}} \quad (\text{VI.4})$$

O desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração, o parâmetro de linearidade exigiu ainda, para comparação, o cálculo da função do 2º grau, bem como o desvio padrão residual. O desvio padrão residual deste ajuste quadrático através da equação VII.5 (ISO 8466-2).

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - (a + b \cdot x_i + c \cdot x_i^2))^2}{N-3}} \quad (\text{VI.5})$$

onde,

x_i – valores individuais de concentração;

y_i - valores individuais de sinal instrumental;

\bar{x} – média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados)

\bar{y} – média dos valores de y (sinal instrumental)

A diferença das variâncias (DS^2) foi calculada pela equação VII.6 onde N é o número de padrões de calibração e o valor de F foi calculada através da equação VII.7

$$DS^2 = (N - 2)S_{\bar{x}}^2 - (N - 3)S_{y2}^2 \quad (\text{VI.6})$$

$$F_{\text{calculado}} = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (\text{VI.7})$$

Comparando o valor do Fcalculado com o valor tabelado da distribuição F-Fisher, para 95% de confiança e f1=1 e f2=N-3 graus de liberdade.

Se Fcalculado ≤ Ftabelado a função de calibração é linear.

Se Fcalculado > Ftabelado a função de calibração é não linear.

Éster	S _{y2}	DS ²	Fcalculado	Ftabelado
Éster 1 Padrão	0,120	5,4x10 ⁻⁰⁴	0,037	10,13
Éster 1 <i>in situ</i>	0,059	7,5x10 ⁻⁰³	2,142	10,13
Éster 2 <i>in situ</i>	0,032	7,5x10 ⁻⁰⁴	0,747	10,13

VII. Precisão resultados de ANOVA

Neste capítulo estão apresentados os resultados do teste de ANOVA para a precisão intermédia avaliada para analistas e dias diferentes. Neste teste a hipótese nula postula que os dois grupos têm médias iguais, verificado por F_0 menor que F crítico, Tabelas VII.1 a VII.2.

Tabela VII.1 Resultados de ANOVA para a precisão intermédia do éster 1 padrão.

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Dos ppm 19/04	6	46,19826	7,6997107	0,002488
Dos ppm 21/04	6	46,1399	7,6899833	0,003096

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,839E-04	1	2,839E-04	0,101661	0,756405189	4,964602701
Dentro de grupos	2,792E-02	10	2,792E-03			
Total	2,821E-02	11				

Tabela VII.2 Resultados de ANOVA para a precisão intermédia do éster 1 *in situ*.

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Dos ppm 07/04	6	51,13548	8,52258	0,012075
Dos ppm 28/04	6	51,72399	8,620666	0,003022

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,028863	1	0,028863	3,823613	0,079036	4,964603
Dentro de grupos	0,075485	10	0,007549			
Total	0,104348	11				

Tabela VII.3 Resultados de ANOVA para a precisão intermédia do éster 2 *in situ*.

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Dos ppm 20/04	6	48,96574	8,1609572	0,008151
Dos ppm 02/05	6	48,56746	8,0945773	0,00247

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,013219	1	1,322E-02	2,489223	0,145708	4,964603
Dentro de grupos	0,053104	10	5,310E-03			
Total	0,066323	11				

VIII. Robustez

A robustez de um método é determinada recorrendo-se ao teste de Youden, que permite analisar pequenas alterações ao método avaliando a influência de cada uma das variações nos resultados finais. Este teste não foi efectuado por falta de tempo, contudo a seguir explica-se os procedimentos e fórmulas de cálculo.

Este teste baseia-se na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra (até oito) realizado segundo um plano de controlo de factores (até ao máximo de sete) susceptíveis de influenciarem os resultados finais. Os ensaios são realizados em replicado, para não causar interpretações erradas. São fixados dois valores, um nominal e um alternativo para quantificação dos desvios dos factores em relação aos factores padrão, normalmente 1 e -1, respectivamente. Elabora-se um quadro para análise dos resultados dos ensaios como se representa na Tabela VII.1.

Tabela VIII.1 Tabela de análise dos resultados para o teste de Youden.

	A	B	C	REi
Ensaio 1				RE1
Ensaio 2				RE2
Ensaio 3				RE3
Ensaio 4				RE4
	RA	RB	RC	

onde:

REi – resultado experimental pela combinação do ensaio i

A, B, C – factores em análise (valor nominal ou valor alternativo)

Ri – efeitos de cada factor (i)

O tratamento dos resultados experimentais seria analisado pela equação VII1

$$Ri = \frac{\sum REi(1) - \sum REi(-1)}{Z} \quad (\text{VIII.1})$$

onde :

Z- corresponde a metade do número de ensaios

Para cada factor é calculado o sistema de equações lineares tendo-se em conta que para metade das experiencias o factor foi mais alterado, equação VII.2.

$$RA = \frac{RE1+RE2-(RE3+RE4)}{2} \quad (\text{VIII.2})$$